



**Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados Faculdade
de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química**



**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA INDIVIDUAL E
SIMULTÂNEA DAS FLUOROQUINOLONAS, LEVOFLOXACINA E
NORFLOXACINA, EMPREGANDO MEIO MICELAR E
PROCEDIMENTO DE DECONVOLUÇÃO**

Uendinara Bilibio

Orientador: Prof^o. Dr. Magno A. G.
Trindade

Dourados – 2014



Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados Faculdade
de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química



**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA INDIVIDUAL E
SIMULTÂNEA DAS FLUOROQUINOLONAS, LEVOFLOXACINA E
NORFLOXACINA, EMPREGANDO MEIO MICELAR E
PROCEDIMENTO DE DECONVOLUÇÃO**

Uendinara Bilibio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof^o. Dr. Magno A. G. Trindade

Dourados – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

B595d Bilibio, Uendinara.

Determinação eletroanalítica individual e simultânea das fluoroquinolonas, levofloxacina e norfloxacina, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução – Dourados, MS : UFGD, 2014.

82 f.

Orientador: Prof. Dr. Magno A. G. Trindade.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.


1. Fármacos – Química. 2. Antibióticos. 3. Fluoroquinolonas. I. Trindade, Magno A. G. II. Título.

CDD: 615.3

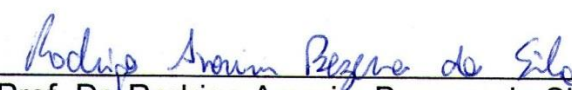


Termo de Aprovação

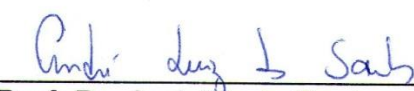
Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Determinação Eletroanalítica Individual e Simultânea das Fluoroquinolonas, Levofloxacin e Norfloxacin Empregando Meio Micelar e Procedimento de Deconvolução", de autoria de Uendinara Bilibio, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. André Luiz Santos
Membro Examinador (UFU)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Dirce e ao meu pai Adelir, por me proporcionarem tudo que precisei, pelo grandioso amor, afeto, carinho que me dão e que tenho comigo sempre, a cada momento da minha vida, pela confiança que depositaram em mim ao acreditar que eu seria capaz de vencer. Apesar de todas as dificuldades, não pensaram em outra hipótese a não se a de me proporcionar à opção de estudo! A minha irmã Crisnara Bilibio pela amizade e ajuda nos momentos difíceis. Meu eterno agradecimento. E a meu amor Rafael Leite Gomes que amo muito.

Em especial dedico este trabalho ao meu irmão Roger Nathaan Bilibio uma pessoa que me deu muita força para chegar onde estou e que não participou desta minha conquista, mas tenho certeza que olhou por mim em todos os momentos que precisei a ele dedico este trabalho de todo meu coração...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que nunca me abandonou e que me proporcionou toda força que fez com que eu alcançasse meus objetivos durante o mestrado.

Agradeço a minha família sempre presente em todos os momentos. Aos meus pais Dirce Veiga Bilibio e Adelir Antonio Bilibio, por toda paciência e apoio nas horas que sempre precisei, pois sempre estiveram ao meu lado. A minha irmã Crisnara Bilibio pelos momentos de apoio. Ao meu amor Rafael Leite Gomes pelo apoio, incentivo e ajuda durante este período.

Ao Prof. Dr. Magno A. G. Trindade, pela orientação, paciência e dedicação durante a realização deste trabalho, pela compreensão das minhas dificuldades, e por me oferecer a oportunidade de desenvolver as atividades depositando em mim confiança e ampliando meus horizontes ao conhecimento.

À minha amiga Cícera, pela amizade, colaboração e força nas horas mais difíceis. E todos aqueles amigos que juntos ficamos nervosos com aquela prova, aquele seminário cujo artigo era complicado, mas juntos buscávamos trocar ideias e decifrar suas entre linhas, as atividades em laboratórios onde aprendemos e vivemos muitas experiências em busca do conhecimento, o papo nas horas de intervalo, o congresso que juntos participamos, os raros momentos de festas e lazer que vivemos esquecendo um pouco as atividades da universidade, somente agradeço o companheirismo e amizade sincera durante estes anos.

Agradeço aos professores do PPGQ, por terem me guiaram no caminho rumo ao conhecimento e aprendizado.

À Universidade Federal da Grande Dourados, FUNDECT e CNPq pela oportunidade de realização desta pesquisa e elaboração do presente trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCTA = brometo de cetiltrimetil amônio

BR = tampão Britton-Robinson

BTAB = brometo de tetrabutil amônio

CLEVO = concentração de levofloxacina

CNOR = concentração de norfloxacina

CTMA = cloreto de tetraetil amônio

DP = desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo

DSS = dioctil sulfocinato de sódio

ECI = eletrodo de carbono impresso

ECV = eletrodo de carbono vítreo

EPC = eletrodo de pasta de carbono

LEVO = levofloxacina

LOD = limite de detecção

LOQ = limite de quantificação

LSS = lauril sulfato de sódio

nd = não detectado

NOR = norfloxacina

TX-100 = triton X-100

UV-Vis = ultravioleta-visível

VC = voltametria cíclica

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

VVL = voltametria de varredura linear

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da quinolonas por geração.....	15
Tabela 2 - Comparação dos dados de medidas de NOR e LEVO ($5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) analisadas individual e simultaneamente sobre superfície de ECV em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) e presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS. Parâmetros da técnica de VOQ: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$	48
Tabela 3 - Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para o desenvolvimento do método eletroanalítico usando voltametria de onda quadrada e eletrodo de trabalho de carbono vítreo.	49
Tabela 4 – Algumas figuras de merito do método eletroanalítico para determinação simultânea de LEVO e NOR utilizando ECV nas condições otimizadas	50
Tabela 5 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão dos métodos proposto obtido para amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações de LEVO e NOR.	52
Tabela 6 - Determinação quantitativa de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.....	53
Tabela 7 - Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para o desenvolvimento do método eletroanalítica usando voltametria de onda quadrada e eletrodo de trabalho de carbono impresso.....	63
Tabela 8 – Algumas figuras de merito do método eletroanalítico para determinação simultânea de LEVO e NOR utilizando ECI nas codições otimizadas.	64
Tabela 9 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão dos métodos proposto obtido para amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações de LEVO e NOR.	67
Tabela 10 - Determinação quantitativa de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.....	68
Tabela 11 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão do método UV-Vis obtido para detecção individual de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações.	70
Tabela 12 - Determinação quantitativa individual de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.....	71
Tabela 13 - Análise comparativa dos diferentes métodos e sistema de detecção empregados para a determinação das fluorquinolonas em urina.	73
Tabela 14 - Análise comparativa dos diferentes métodos e sistema de detecção empregados para a determinação das fluorquinolonas em formulações farmacêuticas.	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura básica das quinolonas (anel quinolônico). 14
- Figura 2** - Estrutura química das fluoroquinolonas levofloxacina (LEVO, A) e norfloxacina (NOR, B). 16
- Figura 3** - Ilustração de um eletrodo de carbono impresso em cerâmica. ER = eletrodo de referência (pseudo Ag), EA = eletrodo auxiliar (tinta de Carbono), ET = eletrodo de trabalho (tinta de Carbono) e CET = contato elétrico ET, CER = contato elétrico ER e CEA = contato elétrico EA. 24
- Figura 4** - Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de LEVO e NOR sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,00 (a) Eletrólito de suporte; (b) 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de NOR; (c) 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LEVO; (d) 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de NOR e 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LEVO. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 35
- Figura 5** - Voltamogramas de pulso diferencial (a) ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $t_p = 10 \text{ ms}$); onda quadrada (b) ($f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$) e varredura linear (c) ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), registrados para a oxidação eletroquímica de 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LEVO e NOR, sobre superfície de ECV em meio de tampão de BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0. 36
- Figura 6** - Estrutura química dos surfactantes: I- Lauril sulfato de sódio (LSS), II- cloreto de tetraetilamônio (CTMA), III- dioctil sulfocinato de sódio (DSS), IV- brometo de tetrabutilamônio (BTBA), V- brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA), VI- Triton X-100 (TX-100). 37
- Figura 7** - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes catiônicos: (a) CTMA, (b) BTAB, (c) BCTA, para a oxidação eletroquímica de 5,85 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de LEVO e NOR sobre superfície de ECV em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$ 38
- Figura 8** - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes neutro: (a) TX-100 e aniônicos: (b) DDS, (c) LSS, para a oxidação eletroquímica de 5,85 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de LEVO e NOR sobre superfície de ECV em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$ 40
- Figura 9** - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactante LSS para a oxidação eletroquímica de 5,85 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de NOR e 5,85 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de LEVO sobre superfície de ECV em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0. (a) Eletrólito de suporte, (b) ausência de LSS, (c) na presença de 5,00 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de LSS, (d) na presença de 2,47 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LSS, (e) na presença de 9,75 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LSS. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$ 42
- Figura 10** - Influência do eletrólito de suporte na intensidade da corrente de pico em VOQ para uma solução de 5,85 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de LEVO e 5,35 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de NOR em: (a) tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0 e (b) tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0. Na presença de 2,47 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ do surfactante LSS sobre superfície de ECV. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$ 44

Figura 11 - Influência do pH na resposta da corrente de pico (A) e do potencial de pico (B) para oxidação eletroquímica de $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR sobre a superfície de ECV em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0 – 8,0) contendo 0,5% de metanol e $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de surfactante LSS. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$ 46

Figura 12 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) na presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS para oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR analisadas simultaneamente sobre superfície de ECV. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$. 47

Figura 13 - VOQ obtido para a oxidação eletroquímica e simultânea de LEVO e NOR sobre superfície do ECV em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) e presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS na presença de amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$. (Inserção) curva de calibração para amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR e sucessivas adições de $1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ das fluoroquinolonas. 51

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos registrados para a oxidação eletroquímica de LEVO e NOR sobre superfície de ECV (A) e ECI (B), em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (a) Eletrólito suporte; (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 55

Figura 15 - Voltamogramas de varredura linear (a) ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $t_p = 10 \text{ ms}$); pulso diferencial (b) ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) e onda quadrada (c) ($f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$), registrados para a oxidação eletroquímica de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR, sobre superfície de ECI em meio de tampão de BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. 57

Figura 16 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes catiônicos: (a) DSS, (b) BCTA, (c) LSS, para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR sobre superfície de ECI em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$ 58

Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactante LSS para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR e $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO sobre superfície de ECI em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. (a) ausência de LSS, (b) na presença de $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS, (c) na presença de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS, (d) na presença de $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS, (e) na presença de $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS e (f) na presença de $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$ 59

Figura 18 - Influência do eletrólito de suporte na intensidade da corrente de pico em VOQ para uma solução de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Na presença de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS sobre superfície de ECI. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$ 61

Figura 19 - Influência do pH na resposta da corrente de pico (A) e do potencial de pico (B) para oxidação eletroquímica de $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR sobre a superfície de ECI em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0 – 7,0) contendo 0,5% de metanol. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$ 62

Figura 20 - Voltamograma de onda quadrada obtido para a oxidação eletroquímica simultânea de LEVO e NOR sobre superfície do ECI em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 5,0) na presença de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS na presença

de amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR. $f = 15 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 4 \text{ mV}$. E curva de calibração (inserção) para amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR e sucessivas adições de $9,90 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ das fluoroquinolonas.....66

Figura 21 - Espectro de absorção de UV-Vis para $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO em 30 % de metanol e $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR em 5% de ácido acético.....69

RESUMO

As fluoroquinolonas constituem uma das mais prescritas classes de medicamentos, sendo aplicadas no tratamento de diversas infecções bacterianas graves tanto em humanos quanto em animais. Todavia, em alguns casos, seu amplo espectro de atividade pode torná-las tão nocivas quanto a própria doença. Ademais, podem ser absorvidas na forma não metabolizadas pelos tecidos de origem animal e/ou excretada em amostras biológicas. Isto pode promover a contaminação de alimentos consumidos pelos humanos, o que pode acarretar, entre outros danos, em uma resistência ao fármaco. Portanto, neste trabalho foram propostos dois novos métodos alternativos para determinar simultaneamente as fluoroquinolonas levofloxacin (LEVO) e norfloxacin (NOR) em diversas matrizes. Para este propósito, utilizou-se como técnica eletroanalítica a voltametria de onda quadrada (VOQ) e como ferramenta auxiliar na separação dos picos o procedimento matemático de deconvolução, foi realizado no software Microcal Origin[®]. A deconvolução foi necessária, pois, embora estas fluoroquinolonas fossem facilmente detectadas individualmente, o mesmo não se aplicou à mistura de ambas, devido a uma sobreposição dos picos voltamétricos. Os estudos iniciais foram realizados sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV), em diferentes eletrólitos suporte e presença de surfactantes, na tentativa de obtenção de voltamogramas com picos voltamétricos satisfatoriamente separados. As condições otimizadas para o ECV foram adaptadas e usadas no emprego dos eletrodos de carbono impressos (ECI). Em ambas as superfícies eletródicas, os voltamogramas foram caracterizados por dois picos, o primeiro observado em 1,04 V (ECV) e 0,73 V (ECI), atribuído à oxidação da LEVO, e o segundo observado em 1,14 V (ECV) e 0,87 V (ECI), atribuído à oxidação da NOR. Após a otimização das condições para o ECV, obteve-se resposta linear para detecção das fluoroquinolonas no intervalo de concentração de $2,00 \times 10^{-6}$ a $2,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($r = 0,999$, $n = 10$) com um limite de detecção de $2,97 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (LEVO) e $7,90 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (NOR). Para os ECIs a resposta voltamétrica foi linear no intervalo de concentração de $2,50 \times 10^{-7}$ a $3,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($r = 0,999$, $n = 7$) com um limite de detecção de $3,20 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (LEVO) e $8,30 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (NOR). A eletroanálise das amostras de urina humana e bovina foi satisfatória, possibilitando a quantificação dessas fluoroquinolonas com recuperação entre 90,2% e 103,1% para LEVO e entre 88,1% e 107,1% para NOR quando empregado ECV e recuperações entre 96,8% e 101,1% para LEVO e entre 98,0% e 100,8% para NOR quando empregado ECI. Assim, os objetivos do trabalho foram atendidos, com desempenho analítico promissor para determinação simultânea de LEVO e NOR sobre a superfície dos ECV e ECI bem como do procedimento de deconvolução de picos.

Palavras chave: eletroanálise, surfactantes, deconvolução, fluoroquinolonas, voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

The fluoroquinolones are some of the most prescribed class of drugs, being used on many bacterial infections treatment, both in humans and animals. However, in some cases, its broad spectrum of activity may take it so harmful as the disease. Moreover, they may be absorbed on the unmetabolized form by the tissues of animal origin and/or excreted in biological samples. It may cause the contamination of the food eaten by humans, which may cause, among others damages, in a drug resistance. Therefore, in this task two new alternative methods were proposed to determine, simultaneously, the fluoroquinolones levofloxacin (LEVO) and norfloxacin (NOR) in several matrices. For this purpose, the square wave voltammetry (SWV) was used as electroanalytical technique and as a tool to help on separation of the peaks, the mathematical deconvolution procedure which was done on the Microcal Origin[®] software. The deconvolution was necessary, because, although these fluoroquinolones were easily detected individually, the same was not applied on the mixture of both, due to an overlap of voltammetric peaks. The initial studies were done on the surface of the glassy carbon electrode (GCE), in different supporting electrolytes and presence of surfactants, on an attempt to obtain voltammograms with voltammetric peaks, satisfactorily separated. The optimized conditions to GCE were adapted and used on screen-printed carbon electrodes (SPCE). In both the electrodic surfaces, the voltammograms were characterized by two peaks, the first observed in 1.04V (GCE) and 0.73V (SPCE), assigned on oxidation of LEVO, and the second observed on 1.14V (GCE) and 0.87V (SPCE), assigned on oxidation of NOR. After optimization of the conditions for the GCE, obtained linear response to fluoroquinolones detection in the concentration range of 2.00×10^{-6} to 2.00×10^{-5} mol L⁻¹ ($r = 0.999$, $n = 10$) with a limit of detection of 2.97×10^{-7} mol L⁻¹ (LEVO) and 7.90×10^{-7} mol L⁻¹ (NOR). For SPCEs, the voltammetric response was linear in the concentration range of 2.50×10^{-7} to 3.00×10^{-5} mol L⁻¹ ($r = 0.999$, $n = 7$) with a limit of detection of 3.20×10^{-8} mol L⁻¹ (LEVO) e 8.30×10^{-7} mol L⁻¹ (NOR). The electroanalysis of human and bovine urine samples were satisfactory, enabling the quantification of these fluoroquinolones with recovery values between 90.2% and 101.3% to LEVO and between 88.1% e 107.1% to NOR when used the GCE and between 96.8% and 101.1% to LEVO and between 98.0% and 100.8% to NOR, when using the SPCE. Thus, the aims of this work were attended, with promising analytical performance for simultaneous determination of LEVO and NOR on the surface of SPCE and GCE.

Keywords: Electroanalysis, Surfactants, Deconvolution, Fluoroquinolones, Square Wave Voltammetry

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Desenvolvimento das fluoroquinolonas	13
1.2 Classificação das quinolonas	14
1.3 Fluoroquinolonas	15
1.4 Métodos Analíticos para Determinação de Fluoroquinolonas	17
1.4.1 Métodos Oficiais	17
1.4.2 Métodos Alternativos	18
1.4.2.1 Métodos Espectrométricos e Cromatográficos.....	18
1.4.2.2 Métodos Voltamétricos.....	21
1.5 Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).....	22
1.6. Eletrodos Impressos.....	23
1.7 Surfactantes	25
1.8 Procedimento de Deconvolução	26
2. OBJETIVOS	29
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	30
3.1 Reagentes, Soluções e Amostra.....	30
3.1.1 Reagentes.....	30
3.1.2 Soluções.....	30
3.1.3 Amostras.....	31
3.2 Equipamentos	31
3.3 Procedimento Experimental	31
3.3.1 Experimentos Voltamétricos	31
3.3.2 Procedimento de Deconvolução	32
3.3.3 Determinação de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina.....	32
3.3.4 Determinação de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas	33
3.3.5 Experimentos Espectrofotométricos.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Desenvolvimento de Metodologia I – Determinação de LEVO e NOR utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo (ECV).....	34
4.1.1 Estudos do comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas LEVO e NOR.....	34
4.1.2 Estudos utilizando diferentes técnicas voltamétricas	35
4.1.3 Influência de surfactantes na resposta voltamétrica	37
4.1.4 Influência do pH do eletrólito suporte.....	42
4.1.5 Deconvolução dos sinais voltamétricos da LEVO e NOR em análise simultâneas	46

4.1.6 Otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais.....	48
4.1.7 Curva analítica.....	49
4.1.8 Aplicação da metodologia desenvolvida	50
4.1.8.1 Determinação de LEVO e NOR em amostra de urina humana e bovina	50
4.1.8.2 Determinação da LEVO e NOR em formulações farmacêuticas	52
4.2 Desenvolvimento de Metodologia II – Determinação de LEVO e NOR utilizando eletrodos de carbono impressos (ECI).....	54
4.2.1 Estudos do comportamento voltamétrico da LEVO e NOR.....	54
4.2.2 Estudos utilizando diferentes técnicas voltamétricas	56
4.2.3 - Influência do surfactante	57
4.2.4 Influência do pH e da solução do eletrólito de suporte	60
4.2.5 Procedimento de deconvolução dos picos voltamétricos	62
4.2.6 Otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais.....	63
4.2.7 Curva analítica.....	64
4.2.8 Aplicação da metodologia desenvolvida	65
4.2.8.1 Determinação de LEVO e NOR em amostras biológicas.....	65
4.2.8.2 Determinação de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas	67
4.3 Desenvolvimento de metodologia III – Estudos espectrofotométricos na região do UV/Vis	68
5 CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os antibióticos constituem uma das mais prescritas classes de medicamentos, sendo empregado no tratamento de diversas infecções bacterianas graves ocasionadas em humanos e animais. Com o uso das sulfonamidas deu-se início a era da quimioterapia antibacteriana. A partir da introdução da penicilina, o mercado de antibacterianos vem sendo dominado por produtos naturais e/ou derivados sintéticos [1].

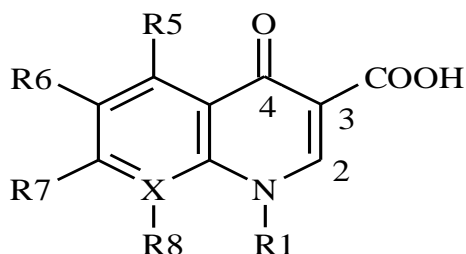
Agentes antibacterianos sintéticos derivados da quinoleína, as quinolonas e fluoroquinolonas, ocupam uma posição de destaque cada vez maior entre esses antibióticos. Embora os primeiros derivados quinolônicos apresentassem efeitos terapêuticos limitados, devido ao rápido desenvolvimento de resistência bacteriana, essa classe teve um grande avanço nas duas últimas décadas. O desenvolvimento desses medicamentos ocorreu devido ao fato das quinolonas e fluoroquinolonas sintetizadas apresentarem uma ampla e eficaz atividade antimicrobiana após administração oral - no tratamento de diversas doenças infecciosas-, sendo também observado baixo efeito colateral e uma menor indução à resistência bacteriana [2]-[5].

1.1 Desenvolvimento das fluoroquinolonas

O desenvolvimento das fluoroquinolonas data de 1962 quando Leshner e colaboradores [6], na tentativa de sintetizar um composto antimalárico a partir da cloroquina, produziram acidentalmente a 7-cloroquinolona, uma substância que apresentou ação contra bactérias Gram-negativas. A partir dos resultados desse estudo foi obtido o ácido nalidíxico, desde então considerado a primeira quinolona de uso clínico. Estudos mostraram que este fármaco atingia concentrações elevadas na urina, mas não no sangue ou outros tecidos. Posto isto, seu uso ficou restrito ao tratamento de infecções do trato urinário não complicado e gastroenterites causadas por bactérias Gram-negativas. Apesar de o ácido nalidíxico ter sido indicado durante vários anos para o tratamento de infecções do trato urinário, este fármaco apresentou um espectro de ação restrito com elevada resistência bacteriana e alguma toxicidade, por isso seu uso foi considerado de baixa relevância [7, 8]. Devido a possibilidade de manipular o núcleo quinolônico, Figura 1, com objetivo de obter compostos com maior atividade antimicrobiana, maior espectro de ação e baixa toxicidade, novas moléculas foram sintetizadas, o que levou ao desenvolvimento das quinolonas. Os derivados do ácido nalidíxico desenvolvidos na década de 70, tais como ácido piromídico, ácido pipemídico e a cinoxacina, apresentaram as mesmas propriedades farmacocinéticas e, embora se associem a

espectro de ação mais abrangente, também tiveram seu emprego restrito ao tratamento de infecções do trato urinário [10].

Figura 1 - Estrutura básica das quinolonas (anel quinolônico).



Fonte: Próprio autor

A inserção do átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico (R_6), Figura 1, representou um avanço considerável no desenvolvimento das quinolonas, pois ampliou a atividade contra organismos gram-negativos, aumentando a habilidade das quinolonas em penetrar nas paredes celulares. Por esta razão, a maioria dos agentes antimicrobianos derivados das quinolonas contem um átomo de flúor na posição 6, sendo consequentemente denominadas fluoroquinolonas [7, 8]. Um avanço nas pesquisas referente aos derivados das quinolonas foi à síntese da norfloxacin, um composto contendo um átomo de flúor na posição 6 (R_6) e um anel piperazinil na posição 7 (R_7), da Figura 1, que apresentou um amplo espectro de ação contra microorganismos aeróbicos Gram-positivos e Gram-negativos, satisfatória absorção e menor toxicidade [10 - 12].

1.2 Classificação das quinolonas

Embora os critérios utilizados pelos diferentes autores para a classificação da quinolonas sejam controversos, estes fármacos em geral são agrupados em três gerações como observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da quinolonas por geração.

1ª GERAÇÃO	2ª GERAÇÃO	3ª GERAÇÃO
Ácido Nalidíxico	Norfloxacin	Grepafloxacin
Ácido Oxolínico	Ciprofloxacina	Tosufloxacin
Ácido Piromídico	Enoxacin	Lomefloxacina
Flumequina	Ofloxacina	Trovafloxacina
Rosoxacin	Levofloxacina	Gatifloxacina
Cinoxacin	Enrofloxacina	Moxifloxacina

As quinolonas de primeira geração abrangem as primeiras quinolonas que foram sintetizadas e que não são fluoradas, com exceção da flumequina. Os fármacos desta geração possuem espectro de ação limitado além de uma rápida indução à resistência bacteriana [1,8].

A segunda geração teve início com a síntese da norfloxacina, essas fluoroquinolonas possuem um enorme potencial no tratamento de um grande número de doenças infecciosas devido ao largo espectro de ação. Apresentam ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Quando comparadas, as quinolonas de primeira geração possuem desvantagem em relação às de segunda geração, pois produzem mutantes resistentes numa frequência maior, além de possuir um estreito volume de distribuição devido a sua menor lipossolubilidade [5, 8].

Por fim, as quinolonas de terceira geração, que com exceção da lomefloxacina e flerofloxacina, são mais ativas contra bactérias Gram-positivas, podendo ser utilizadas com maior eficácia no tratamento de infecções das vias aéreas. A terceira geração das quinolonas apresentam, frequentemente, aceitáveis propriedades farmacocinéticas, que englobam alta biodisponibilidade, boa penetração celular e elevado tempo de meia vida. Além de apresentarem boa eficácia terapêutica em adultos nas infecções do trato urinário, aparelho respiratório, trato gastrointestinal, peles, tecidos mole, infecções articulares e ósseas e doenças sexualmente transmissíveis [1,5].

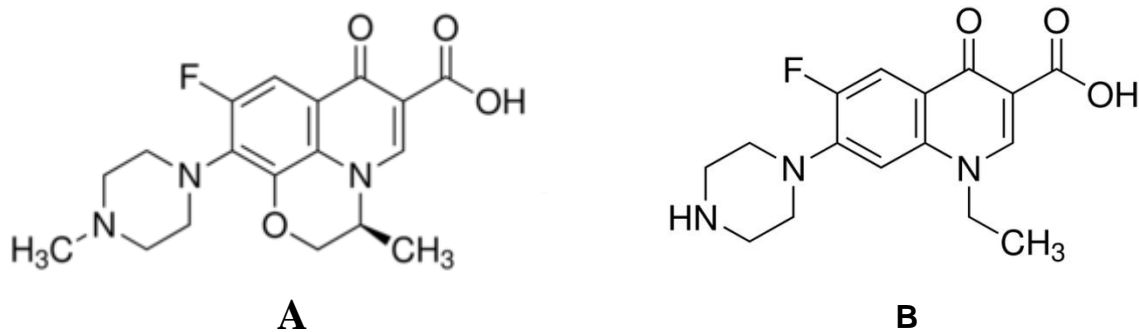
1.3 Fluoroquinolonas

Conforme mencionado anteriormente, as fluoroquinolonas são importantes agentes antibacterianos, eficazes no tratamento de uma série de infecções graves. A diferença entre um fármaco do grupo das quinolonas e do grupo das fluoroquinolonas é a presença de um ou mais átomos de flúor na molécula, resultando em um composto fluorado com maior atividade

antibacteriana bem como maior penetração intracelular [1,5]. Estes fármacos apresentam propriedades farmacocinéticas que incluem alta biodisponibilidade, extensiva penetração nos tecidos, baixa ligação proteica e, principalmente, elevado tempo de meia vida. Após a administração oral, parte do medicamento é rapidamente absorvido pelos tecidos do corpo, alcançando concentrações plasmáticas entre 1 e 4 horas, e uma fração significativa é excretada na urina de forma inalterada [14]. Um exemplo típico, é o fármaco levofloxacin (LEVO), que possui um tempo de meia vida entre 6 e 8 horas, permitindo uma administração diária em doses de 500 mg. A biodisponibilidade absoluta de uma dose oral de 500 mg de LEVO pode alcançar a 99% e, após a sua administração, cerca de 80% é recuperada, na urina, na forma inalterada num período de 48 horas [15].

Outro exemplo, é o fármaco norfloxacin (NOR), que possui um tempo de meia vida entre 3 e 4 horas, permitindo uma administração diária em doses de 400 mg e, após sua administração, cerca de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ deste fármaco é encontrado na urina [16].

Figura 2 - Estrutura química das fluoroquinolonas levofloxacin (LEVO, A) e norfloxacin (NOR, B).



Fonte: Próprio autor

Com o aumento no consumo desta classe de antibiótico, tem se constatado um número expressivo de pacientes que desenvolvem algum tipo de efeitos colaterais [17,18]. Os sintomas têm sido associados a efeitos graves aos sistemas músculo-esquelético, cardiovascular, nervoso central e periférico, circulatório, endócrino, gastrointestinal, urinário, ao fígado, ao cérebro, a pele e os sistemas sensoriais [17,18]. As fluoroquinolonas entre outras quinolonas estão entre os fármacos que mais acarretam reações adversas graves de modo que, em alguns países, muitos foram retirados do mercado devido preocupações de saúde e segurança. Entre as quais, incluem-se a gatifloxacin, grepafloxacin, temafloxacin, trovafloxacin e alatrofloxacin [17-21].

Outro fator preocupante é a administração desses fármacos concomitantemente. Em alguns casos, esta ingestão pode provocar reações adversas e ser fatal. A Teofilina e a Warfarina, por exemplo, podem ser altamente tóxica quando ingeridas juntamente com algumas fluoroquinolonas, necessitando cuidados especiais e monitoramento rigoroso dos pacientes tratados com estes medicamentos [22, 23].

Como observado, os antibióticos com amplo espectro de atividade contra bactérias podem ser quase tão prejudiciais quanto a própria doença, por isso o uso de algumas fluoroquinolonas deve ser rigorosamente controlado [24 - 25]. Algumas fluoroquinolonas podem ser sorvidas em tecidos e/ou excretadas no leite, urina e outras amostras biológicas, podendo atingir uma excreção de até 80 % na forma não metabolizada [24 - 26]. Os resíduos de fluoroquinolonas em alimentos de origem animal também podem causar resistência em indivíduos saudáveis, através da ingestão indireta do medicamento [27 - 29].

Considerando que a contaminação residual de drogas em alimentos é um grande problema de saúde em todo o mundo [29], um fator relevante é a determinação do acumulado de drogas não metabolizadas em alimentos, entretanto, para isso faz-se necessário à utilização de métodos analíticos confiáveis. Do ponto de vista da indústria farmacêutica, a análise de amostras desempenha um papel importante em várias fases de desenvolvimento [30], desde o controle na formulação do produto, até a concentração final da droga e excreção do princípio ativo na forma não metabolizada em tecidos animais. A disponibilidade de métodos analíticos simples, rápidos e confiáveis para controle de qualidade dos produtos farmacêuticos e o monitoramento da concentração da droga em alimentos de origem animal e amostras biológicas são altamente desejáveis e são tão importante quanto à pesquisa para a descoberta de novas fluoroquinolonas potentes com melhores propriedades farmacocinéticas.

1.4 Métodos Analíticos para Determinação de Fluoroquinolonas

1.4.1 Métodos Oficiais

É incumbência das Farmacopeias, fornecerem metodologias com as especificações de qualidade dos produtos farmacêuticos – desde as matérias primas utilizadas na fabricação dos medicamentos até a embalagem final [14]. As especificações regulam as relações de importação e exportação, além de estabelecerem pré-requisitos de qualidade do princípio ativo e das especialidades farmacêuticas produzidas ou usadas no Brasil e no exterior [23]. As

monografias contendo essas especificações auxiliam a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no controle de qualidade de medicamentos e insumos para saúde.

Algumas farmacopeias utilizam técnicas analíticas instrumentais para determinar o teor de princípios ativos de medicamentos a base de fluoroquinolonas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica indicada pela Farmacopeia Norte-Americana, USP 24, para análises de formulações farmacêuticas com objetivo de determinar a cinoxacina e a ciprofloxacina [14, 32]. A Farmacopeia Britânica recomenda que as preparações farmacêuticas sejam analisadas por espectroscopia na região do ultravioleta ou titulação potenciométrica em meio não aquoso para determinação do ácido nalidíxico, sendo este último procedimento também empregado na determinação de norfloxacina [14, 33].

Na Farmacopeia Brasileira, Parte II da 5ª edição [34], encontram-se disponíveis monografias referentes à análise de formulações, as quais descrevem metodologias de quantificação empregando a CLAE com detecção espectrofotométrica e também os métodos potenciométricos. É evidente que, com exceção da potenciometria, os métodos oficiais empregados para análises de preparações farmacêuticas e monitoramento da qualidade do medicamento envolvem apenas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Além disso, nenhum esforço tem sido dedicado na determinação quantitativa de resíduos desses medicamentos em amostras biológicas, cujas análises poderiam fornecer resultados relevantes para o acompanhamento da toxicidade desses medicamentos em pacientes que os ingerem acidentalmente. Algumas metodologias analíticas empregando as técnicas espectrofluorimétricas, cromatográficas e voltamétricas, apesar de não citadas nas Farmacopeias consultadas, são descritos em vários artigos e revisões encontrados na literatura, os quais propõem análises de diversas amostras biológicas. Assim, uma breve descrição de alguns desses métodos será apresentada a seguir.

1.4.2 Métodos Alternativos

1.4.2.1 Métodos Espectrométricos e Cromatográficos

Na literatura encontram-se diversas publicações envolvendo a quantificação de medicamentos [14, 35], utilizados para o tratamento de diferentes tipos de infecções, cujas análises são aplicadas em amostras mais complexas como sangue, plasma, urina, tecido humano e animal. Essas publicações fornecem informações sobre métodos de extração, purificação e pré-concentração, os quais a partir de algumas adaptações podem ser utilizados

na determinação de antibióticos fluoroquinolados em matrizes mais complexas, como as amostras biológicas [14, 35]. Devido a essa diversidade de métodos de análises, reportar-se-á apenas alguns exemplos para cada técnica analítica, destacando aqueles desenvolvidos para determinação de fluoroquinolonas utilizados no desenvolvimento deste trabalho, ou seja, LEVO e NOR.

As técnicas espectrométricas com absorção tanto na região do ultravioleta quanto na região do visível são simples, de baixo custo e de fácil execução quando se trata de quantificação de analitos orgânicos. A habilidade de fornecer espectros em poucos segundos, tornam os métodos espectrofotométricos insubstituíveis em certos ramos da química analítica. Todavia, devido à falta de seletividade destas técnicas e a complexidade de algumas matrizes, nas análises de amostras biológicas, há um problema de sobreposição espectral, sendo necessárias etapas de separação dos interferentes do analito de interesse [14]. Em sistemas complexos, como os de amostras de tecidos animais e humanos, as bandas de absorção se apresentam de forma larga e com alta sobreposição espectral. Assim, para contornar os problemas decorrentes da sobreposição espectral entre analito/interferente, são necessários sofisticados métodos de extração, além de aplicações de cálculos matemáticos (espectroscopia derivativa) que, muitas vezes não fornecem resultados satisfatórios. Além disso, os métodos espectrofotométricos apresentam altos limites de detecção, o que inviabiliza sua aplicação na análise de amostras contendo baixos teores do analito de interesse.

Para exemplificar alguns dos trabalhos sobre o uso desta técnica, González e colaboradores [36] desenvolveram um método para análise de LEVO em amostras de formulações farmacêuticas, soro e urina humana. O método baseia-se no emprego da técnica espectrofluorométrica com detecção em $\lambda_{\text{exc.}} = 292 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emis.}} = 494 \text{ nm}$, cuja análise é feita em meio aquoso. Resultados satisfatórios foram obtidos para o antibiótico adicionado nas amostras analisadas com medição de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no soro e de $420,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ na urina humana, em soluções de $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de dodecilsulfato de sódio (pH 5).

Stankova e colaboradores [37] desenvolveram uma metodologia para análise de norfloxacin em amostras de formulações farmacêuticas, utilizando a técnica de espectrofotometria de fluorescência. A determinação de norfloxacin foi feita em meio de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de dodecilsulfato de sódio e as medidas foram realizadas no comprimento de emissão de 450 nm e de excitação de 320 nm . Obtendo-se limite de detecção de $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Na literatura encontram-se outras publicações abrangendo a quantificação de

fluoroquinolonas em diversas amostras [14, 38, 39], nas quais encontram-se alternativas para contornar problemas de interferências causadas pelos constituintes da matriz.

Dentre as metodologias alternativas para detecção e quantificação de fluoroquinolonas em amostras biológicas e formulações farmacêuticas, os métodos cromatográficos, mais especificamente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV/Vis, tem sido a técnica analítica mais empregada. Esta técnica possui a vantagem de separar e quantificar satisfatoriamente um maior número de substâncias em matrizes mais complexas, sendo esta destacada em relação às demais. Neste caso, a CLAE permite obter resultados satisfatórios e confiáveis em função da possibilidade de separação dos interferentes usando uma coluna adequada. Por conseguinte, pesquisadores buscam alternativas para aperfeiçoar os sistemas de detecção, bem como a minimização de interferências oriundas da matriz, isso ocorre devido a sofisticados procedimentos de tratamento das amostras antes das análises [14].

Dentre os trabalhos encontrados, Wong e colaboradores [40] reportaram que a levofloxacinina pode ser quantificada empregando a CLAE com detecção UV, cuja detecção é realizada após o processo de extração líquido-líquido para isolá-la dos interferentes das matrizes biológicas, plasma e urina humana. O composto foi separado em uma coluna de fase reversa C18 e quantificado pela medida da absorbância em um $\lambda = 330$ nm. O método apresentou uma relação linear no intervalo de concentração de levofloxacinina entre 0,08 e 5,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no plasma e 23 e 1464 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na urina humana.

Ainda em relação à levofloxacinina, foi encontrada uma metodologia cromatográfica com detecção espectrofluorométrica, a qual foi desenvolvida por Sousa e colaboradores [41]. Neste trabalho, foi realizada uma análise simultânea das fluoroquinolonas: levofloxacinina, pazufloxacinina, gatifloxacinina, moxifloxacinina e trovafloxacinina em amostras de plasma humano. As amostras foram pré-tratadas com acetonitrila para a precipitação das proteínas do plasma e, posterior análise usando uma coluna C18. A fase móvel foi composta por uma mistura de 0,10 % de ácido fórmico aquoso ajustado a pH 3,00 com trietilamina, acetonitrila e metanol com vazão de 1,00 mL min^{-1} , a detecção em $\lambda_{\text{exc.}} = 260$ nm, e, $\lambda_{\text{emis.}} = 455$ nm. Resultados satisfatórios foram obtidos para a análise simultânea desses antibióticos fluoroquinolados, sendo que para levofloxacinina a curva de calibração foi linear na faixa de 0,02 a 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de quantificação de 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Um método semelhante foi desenvolvido por Samanidou e colaboradores [42], em que a CLAE acoplada ao detector de UV/Vis (detecção em 275 nm) foi empregado para a determinação de norfloxacin, enoxacin, ofloxacin e ciprofloxacina em amostras de formulações farmacêuticas e soro sanguíneo. Neste método, os autores realizaram um tratamento prévio das amostras com acetônitrila para a precipitação de proteínas. Neste caso, a metodologia foi suficiente para a detecção das quatro fluoroquinolonas estudadas, permitindo a quantificação da ordem de 2,0 ng μL^{-1} para enoxacin, 12,0 ng μL^{-1} ofloxacin, 3,0 ng μL^{-1} norfloxacin e 5,0 ng μL^{-1} ciprofloxacina.

Venkata e colaboradores [43] por sua vez desenvolveram uma metodologia analítica para análise de amostra de soro e urina humana e determinação de norfloxacin. O método baseia-se no uso da CLAE com detecção no UV em comprimento e onda de 273 nm, cuja análise envolve uma extração da norfloxacin das amostras com cloreto de metileno e hidróxido de sódio a pH 7,5. Resultados satisfatórios foram obtidos, permitindo quantificação da ordem de 0,10 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o soro e 1,0 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a urina.

As metodologias resumidas nos parágrafos anteriores relatam a análises de amostras contaminadas com os analitos de interesse. Poucos são os trabalhos que descrevem a determinação desses analitos em amostra biológica reais. Informações adicionais sobre métodos alternativos de análises de amostras biológicas e formulações podem ser encontradas em revisões sobre o assunto [14, 35] e, também em artigos científicos que empregam técnicas eletroanalíticas [44 - 52], cujos trabalhos propõem métodos de extração e detecção de várias fluoroquinolonas em uma variedade de matrizes.

1.4.2.2 Métodos Voltamétricos

Os métodos voltamétricos são empregados na determinação de vários compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos, em diversas matrizes, com possibilidade de detecção do analito em solventes aquosos e não aquosos. Em relação às quinolonas, a presença de um grupo carbonílico, de um grupo carboxílico e de duplas ligações C-C em sua estrutura indicam que estas substâncias podem ser eletroativas. Assim sendo, a utilização das técnicas eletroanalíticas para a detecção de fármacos pode ser relevante, uma vez que esta pode atender alguns requisitos para testes analíticos simples, rápidos, sensíveis e econômicos, com capacidade de identificar determinar compostos em concentrações a níveis baixíssimos, além de suprimir etapas de pré-tratamento para eliminar interferentes presente nas matrizes e baixo custo de equipamentos e materiais utilizados [53-55].

Neste sentido, o desenvolvimento de novas metodologias pode contribuir favoravelmente para o estabelecimento de novas legislações que possam fornecer um controle mais efetivo destes medicamentos e suas formas derivadas em tecidos animais e derivados do leite, aumentando a credibilidade de produtos regionais comercializados no cenário nacional e internacional.

1.5 Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

Quando se trata de desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas as técnicas voltamétricas destacam-se, dentre estas, a voltametria de onda quadrada (VOQ), pois esta é uma das técnicas eletroquímicas de pulso mais rápidas e sensíveis. A aplicação desta técnica tem gerado resultados aceitáveis em termos de perfil voltamétrico e intensidade de sinal, isso independentemente do tipo de processo redox. Os limites de detecção (LOD) dessa técnica são comparáveis aos obtidos pelas técnicas de cromatografia e espectroscopia [56]. A maior vantagem da técnica consiste na utilização de altas velocidades de varredura com reduzida corrente capacitiva, em que é possível obter correntes de pico melhor definidas, melhorando a sensibilidade da mesma. Ademais, é possível obter dados mecanísticos e cinéticos do processo eletródico em estudo e como vantagem em relação às demais técnicas voltamétricas. Além disso, é possível utilizar modelos matemáticos, para diagnosticar tipos de processos redox, que considera as espécies eletroativas adsorvidas na superfície do eletrodo [57].

Radi e colaboradores [49] relatam a determinação de fluoroquinolonas utilizando a técnica de VOQ, cujo método consiste na determinação de levofloxacina pela técnica de VOQ sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Após a otimização dos parâmetros e das melhores condições de trabalho, a curva analítica apresentou linearidade na faixa de concentração de $6,0 \times 10^{-9}$ a $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. A aplicação do método para quantificação de levofloxacina na amostra foi realizada pelo método de adição de padrão, obtendo recuperação média de 97,7% para a análise de amostras de urina humana, indicando uma viabilidade de utilização da técnica. Ainda no desenvolvimento dessa metodologia foi observado e diagnosticado um processo de transferência eletrônica irreversível.

Em trabalho similar Ghoneim e colaboradores [58] estudaram o comportamento eletroquímico e determinação da fluoroquinolona norfloxacin, em formulação farmacêutica e urina humana utilizando a técnica de VOQ sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo. Após o diagnóstico de um processo de transferência eletrônica irreversível, foi realizada a

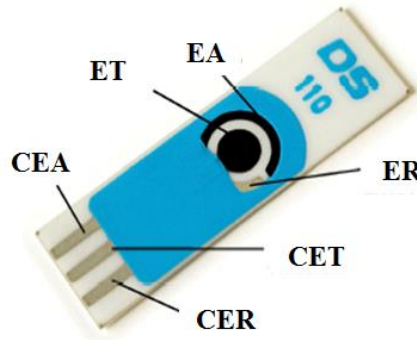
otimização dos parâmetros de melhor condição de trabalho. Para a construção da curva analítica obteve-se resposta linear na faixa de concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

1.6. Eletrodos Impressos

Em busca de metodologias analíticas práticas com aplicação em amostras contendo baixos níveis de concentração do analito de interesse, destacam-se os eletrodos impressos. O desenvolvimento deste tipo de eletrodo é destacado, quando objetiva-se a praticidade no uso aliada a uma maior detectabilidade, devido à possibilidade de modificação da superfície do eletrodo de trabalho. A busca por praticidade tem estimulado o desenvolvimento de sensores eletroquímicos e dispositivos eletródicos contendo os três eletrodos no mesmo suporte para os eletrodos impresso, por exemplo, para obtenção de melhor desempenho e facilidade de restauração da superfície do eletrodo após o uso, considerando que o fator de restauração da superfície é um dos maiores obstáculos na utilização de eletrodos sólidos [54]. Adaptações no tamanho e arranjo desses eletrodos têm proporcionado eletrodos multifuncionais, sensíveis, seletivos, de fácil uso e com possibilidade de realização de análises em campo [54, 59, 60].

O eletrodo de carbono impresso consiste em um depósito de filme de carbono ou outro material condutor sobre um suporte inerte, geralmente PVC, cerâmica, ou vidro [54, 59, 60]. O filme é parcialmente coberto por uma segunda camada fina de um material isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade, como mostra a Figura 3.

Figura 3 - Ilustração de um eletrodo de carbono impresso Dropsens (DS 110) em cerâmica. ER = eletrodo de pseudo referência (Ag), EA = eletrodo auxiliar (tinta de Carbono), ET = eletrodo de trabalho (tinta de Carbono) e CET = contato elétrico ET, CER = contato elétrico ER e CEA = contato elétrico EA.



Fonte: Próprio autor.

Esses eletrodos, além de serem passíveis de fabricação em máquinas de *silk screen*, estão disponíveis comercialmente em várias empresas que revendem potenciostatos. A maioria dos modelos de eletrodos com tintas condutores e isolantes comerciais são de baixo custo e patenteadas, ou seja, a fabricação não é revelada apropriadamente [59].

Uma das vantagens desse tipo de eletrodo é a fácil manipulação e apresentação de um sistema completo, contendo eletrodo de trabalho, auxiliar e referência impresso no mesmo suporte e com área significativamente reduzida. Estes eletrodos também apresentam sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade, robustez, resposta rápida e facilidade de uso, requisitos para análise rotineira nas indústrias. Além disso, são de fácil fabricação, possibilitando a produção em larga escala [54, 59, 60]. Na literatura há relatos de trabalhos que utilizam eletrodos impressos para quantificação de diversas espécies, orgânicas e inorgânicas, cujos resultados são satisfatórios e disseminam a aplicação destes eletrodos em sistemas de detecção e desenvolvimento de novas metodologias analíticas. Assim, uma breve revisão de trabalhos que utilizam eletrodos impressos será apresentada a seguir.

Radi e colaboradores [61] desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de gemifloxacina em formulações farmacêuticas utilizando eletrodo de carbono impresso e a técnica de voltametria de pulso diferencial. Após a otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais, foi construída uma curva de calibração que apresentou linearidade na faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Embora a amostra seja de baixa complexidade, o valor de recuperação situado entre 96,3% e 103,6%, evidencia

que o método pode ser usado com sucesso na determinação de gemifloxacina em formulações farmacêuticas.

Bergamini e colaboradores [62] desenvolveram um método eletroanalítico para determinação de aurotiomalato em amostras de urina humana usando voltametria de varredura linear e eletrodos de carbono impresso. O método também foi aplicado com sucesso na determinação do aurotiomalato na matriz, com um limite de detecção da ordem de $6,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Em outro trabalho exemplificando o uso dos eletrodos impressos, Trindade e Zanoni [59] desenvolveram um método para quantificação do corante Solvent Blue 14 (SB-14) em amostras de combustíveis usando diversas técnicas eletroquímicas. Os autores utilizaram eletrodos de carbono impresso e surfactantes para a detecção de SB-14, cujo sistema permitiu desenvolver um método e aplicá-lo com sucesso na determinação do corante em amostras de combustíveis. O limite de detecção para este sistema foi de $9,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e valores de recuperação entre 82 e 99%.

1.7 Surfactantes

Surfactantes ou tensoativos são substâncias constituídas por uma parte polar (região hidrofílica) e outra parte apolar (região hidrofóbica). A parte apolar é geralmente uma cadeia de hidrocarboneto com 6 até 22 átomos de carbono (normalmente linear). Por outro lado, a parte polar é classificada de acordo com sua porção hidrofílica, que pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica e anfótera [63 - 65]. Por causa da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), formando um filme molecular ordenado nas interfaces o que reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas características permitem que os surfactantes sejam utilizados para diversas aplicações industriais como: detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização, dispersão de fases e em experimentos eletroquímicos [63 - 65].

Na literatura encontram-se diversos trabalhos com estudos eletroquímicos da interação que ocorre entre surfactante e espécie eletroativa, bem como as interações entre surfactante/eletrodo [62,66 - 72]. Dentre esses trabalhos, alguns tratam a importância do uso de surfactantes para minimizar ou até mesmo suprimir a passivação da superfície eletródica, ocasionada pela adsorção de produtos eletrogerados. Os surfactantes também têm sido

utilizados com sucesso para minimizar problemas advindos de matrizes complexas, uma vez que interferentes presentes nestas amostras podem adsorver, irreversivelmente, na superfície eletródica e inativá-la parcialmente ou totalmente [73 - 76].

Os surfactantes também podem desempenhar um papel importante na melhoria da separação de picos sobrepostos em determinações simultâneas. Neste sentido, Hosseinzadeha e colaboradores [77] relataram o uso de um surfactante como alternativa satisfatória no deslocamento do potencial e, conseqüentemente, melhora na separação dos picos durante a determinação simultânea de ácido ascórbico e dopamina. Da mesma forma, Caramit e colaboradores [78] empregaram surfactante, contendo um surfactante catiônico, como condição ideal para melhorar a resolução voltamétrica e separação dos picos de dois antioxidantes durante a detecção simultânea.

É importante ressaltar que existem inúmeras obras que descrevem o papel vantajoso de surfactantes em eletroquímica na separação de picos. No entanto, neste trabalho relatou-se apenas uma pequena parte destes trabalhos. Neste sentido, priorizaram-se os trabalhos que demonstrassem as vantagens na utilização de surfactantes para separação de picos em análises simultâneas, na manutenção da superfície ativa do eletrodo, além da amplificação da corrente de pico durante a detecção de alguns analitos orgânicos em diversas amostras complexas.

1.8 Procedimento de Deconvolução

A deconvolução é considerada uma ferramenta matemática, cujo uso tem sido satisfatório, para ser utilizada na melhoria da separação de sinais sobrepostos [79]. O procedimento de deconvolução é utilizado para separação de sinais complexos detectados por diversos equipamentos analíticos e nas diversas áreas de estudos. Na literatura há relatos de aplicação da deconvolução no uso de técnicas termogravimétricas, cromatográficas, espectroscópicas e eletroanalíticas [80-83]. Nas análises envolvendo técnicas eletroquímicas, o procedimento de deconvolução permite determinar precisamente áreas, posições bem como intensidades dos picos anteriormente sobrepostos, desde que exista uma menor diferença de potenciais de picos de 60 mV [80]. O procedimento de deconvolução em eletroquímica é considerado uma alternativa nos casos em que a sobreposição do sinal voltamétrico não é visível ou, que, demanda um trabalho excessivo no processo de separação desses picos.

Como exemplo de sucesso no uso da deconvolução para separação de picos sobrepostos, Garbellini e colaboradores [83] mostraram que para a redução simultânea dos herbicidas atrazina e ametrina é necessário tal procedimento. Neste estudo, foi mostrado que a

atrazina apresentou um pico de redução em $-0,98$ V, enquanto que a ametrina um pico de redução $-1,04$ V vs. Ag/AgCl, cujos sinais foram totalmente sobrepostos quando detectados simultaneamente. Portanto, os autores deconvoluíram a região em duas gaussianas, obtendo inclusive os voltamogramas dos picos deconvoluídos, e determinaram com maior precisão e exatidão a área, a corrente e o potencial de pico para as duas substâncias estudadas. Utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada sobre superfície de um eletrodo de mercúrio, o procedimento de deconvolução foi indispensável para a determinação simultânea dos herbicidas atrazina e ametrina, permitindo resultados satisfatórios de recuperação para análises de amostras de água potável.

Destaca-se ainda a utilização da técnica de deconvolução no trabalho desenvolvido por Elsabee e colaboradores [80] para a determinação dos picos endotérmicos de amostras de ácido benzóico e o cloridrato de efedrina após análise empregando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Com a finalidade de contornar problemas de sobreposição dos picos cromatográficos registrados com a técnica de cromatografia gasosa com detector de massa, após análises de uma variedade de pesticidas em frutas e legumes através, Norli e colaboradores [81] também utilizam o procedimento de deconvolução. No trabalho, 82 amostras foram analisadas e com a aplicação da deconvolução, além dos 85 pesticidas encontrados por interpretação manual dos cromatogramas, outros pesticidas 73 pesticidas foram detectados com a separação precisa dos picos, todos em níveis de concentração entre $0,02$ e $0,10$ mg kg⁻¹. Assim, os autores relatam que o sistema utilizado para separar, satisfatoriamente, os picos sobrepostos também apresenta grande potencial para determinar os agrotóxicos que, normalmente, não são procurados nestas matrizes.

Em outro trabalho Marbán e colaboradores [82] utilizam a deconvolução para resolver problemas de sobreposição de picos encontrados em espectros de azul de metileno durante experimentos de fotoirradiação. Assim, a deconvolução foi aplicada com sucesso para estimar a contribuição de produtos intermédios no espectro obtido. De acordo com os autores, a maioria dos estudos de avaliação da concentração de azul de metileno por espectroscopia operando na região do visível é mascarado pela presença de intermediários durante a reação, o que resulta em sobreavaliação da quantidade presente da espécie de interesse.

Nos trabalhos discutidos, comprova-se que a deconvolução é uma ferramenta auxiliar e muito poderosa para a separação de sinais sobrepostos, pois a partir desse procedimento muitas vezes é possível a obtenção do sinal com maior definição. Para a realização do

procedimento de deconvolução existem vários softwares, entre os quais, o mais comum e empregado em estudos eletroquímicos é o software comercial Microcal Origin[®]. Portanto, neste trabalho pretende-se desenvolver metodologias eletroanalíticas para a aplicação na determinação simultânea de LEVO e NOR em amostras farmacêuticas e biológicas, tendo como ferramenta auxiliar o procedimento de deconvolução.

2. OBJETIVOS

Considerando a contaminação de alimentos consumidos pelos humanos e a resistência aos antibióticos fluoroquinolonas – devido à ingestão involuntária –, bem como a necessidade de um método analítico para análise simultânea de LEVO e NOR, neste trabalho objetiva-se:

- Utilizar surfactantes como alternativa para melhorar a separação e intensificar os picos voltamétricos de ambas as fluoroquinolonas;

- Desenvolver um procedimento de deconvolução dos picos voltamétricos para promover a separação de ambos e auxiliar na detecção simultânea das fluoroquinolonas;

- Desenvolver métodos eletroanalíticos, para determinar individualmente e simultaneamente, LEVO e NOR, empregando eletrodos de carbono vítreo e eletrodos de carbono impresso;

- Aplicar a metodologia desenvolvida na determinação individual e simultânea de LEVO e NOR e propor um método alternativo para o controle de qualidade dessas fluoroquinolonas em formulações farmacêuticas e a determinação em amostras biológicas;

- Comparar os resultados com aqueles obtidos com a técnica de espectrofotometria de absorção molecular com detecção no UV-vis.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, Soluções e Amostra

3.1.1 Reagentes

Os padrões das fluoroquinolonas (grau analítico) utilizados nos experimentos foram: levofloxacin (LEVO) e norfloxacin (NOR) obtidos da Sigma-Aldrich[®], ambas com grau de pureza de 98,0%, as quais foram usadas sem purificação prévia.

Os reagentes, ácido acético (Fluka), ácido bórico (Merck), ácido ortofosfórico (Merck), hidróxido de sódio (Merck), fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Merck), fosfato de sódio monobásico monohidratado (Merck), metanol (Vetec) foram utilizados no preparo das soluções dos eletrólitos suporte.

Os surfactantes lauril sulfato de sódio (LSS), cloreto de tetraetil amônio (CTMA), dioctil sulfocinato de sódio (DSS), brometo de tetrabutil amônio (BTBA), brometo de cetiltrimetil amônio (BCTA) e triton X-100 (TX-100), foram utilizados nos experimentos eletroquímicos.

A água utilizada nos experimentos foi ultrapurificada (condutividade 18.2 MΩ cm⁻¹) com um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

3.1.2 Soluções

Soluções estoque de LEVO foram preparadas a partir da dissolução de quantidades apropriadas de LEVO em soluções mista contendo (7:3, v/v) água/metanol. Já as soluções de NOR foram preparadas em 5,0 % de ácido acético em água. Soluções diluídas de LEVO e NOR na concentração desejada (entre 5,00×10⁻⁷ mol L⁻¹ e 1,00×10⁻² mol L⁻¹) foram preparadas, por diluição de alíquotas da solução estoque ou por adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

Soluções dos surfactantes foram preparadas a partir da pesagem direta em balão volumétrico e, a seguir, dissolução com água purificada até a concentração desejada.

A solução do tampão Britton-Robinson (BR), usadas como eletrólito suporte, foi preparada a partir da mistura de ácido acético 0,04 mol L⁻¹ (Fluka), ácido ortofosfórico 0,04 mol L⁻¹ (Merck) e ácido bórico 0,04 mol L⁻¹ (Merck). O ajuste do pH desejado foi realizado com hidróxido de sódio 0,20 mol L⁻¹ (Merck). O tampão fosfato foi preparado pela dissolução da massa apropriada dos reagentes em balões volumétricos.

3.1.3 Amostras

As amostras de urinas foram coletadas de indivíduos (com seu consentimento) e animais saudáveis. Amostras de formulações farmacêuticas foram cedidas gentilmente pelo Dr. Indonésio Callegari.

3.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um bipotenciostato portátil DropSens modelo μ Stat 400, interfaceado a um microcomputador e controlado pelo software Drop View para aquisição dos dados. O software Microcal Origin[®] (versão 6.0) foi utilizado para o procedimento de deconvolução dos picos.

Os eletrodos impressos de carbono foram adquiridos da empresa DropSens. O arranjo destes eletrodos impressos de 3,4 cm \times 1,0 cm \times 0,05 cm (comprimento \times largura \times altura) consiste de três partes que são compostas por um contra-eletródo de carbono, um eletródo pseudo-referência de prata e um eletródo de trabalho (4,0 mm de diâmetro) de carbono em um substrato de cerâmica com contatos elétricos de prata (Figura 3). Além disso, um sistema de três eletrodos foi utilizado para realizar testes com outra superfície eletródica, consistindo de um eletródo de referência de prata/cloreto (Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹), um fio de platina como eletródo auxiliar e um eletródo de trabalho carbono vítreo.

As medidas de pH foram realizadas em pH-metro digital (ION/ Modelo PHB 500). Um banho ultrassom (UNIQUE/ Modelo USC 800) foi utilizado para dissolução e homogeneização dos reagentes. Uma centrífuga (Excelsa[®] II/ Modelo 206 BL) foi utilizada para separação de proteínas precipitadas das amostras de urina e também para separação dos excipientes das amostras de fármacos.

Para as medidas espectroscópicas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis, Cary 50/Varian.

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Experimentos Voltamétricos

Os estudos iniciais empregando o eletródo de carbono vítreo (ECV) e os eletrodos de carbono impressos (ECI), foram realizados transferindo-se 5,0 mL e 10,0 mL, respectivamente, da solução do eletrólito suporte (pH 7,0) para a célula eletroquímica e submetendo-a a agitação por 10 segundos, com nitrogênio. Em seguida, foram registradas as medidas voltamétricas, mediante varredura em um intervalo de potencial pré-estabelecido.

Depois de registradas as medidas para o eletrólito suporte (branco), uma alíquota da solução estoque da(s) fluoroquinolona(s) e/ou surfactante foi adicionada na célula, registrando os voltamogramas, conforme o mesmo procedimento citado acima. Antes de cada medida experimental, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida com uma solução de alumina 0,50 μm e, em seguida, enxaguada com água destilada. Para os eletrodos de carbono impresso (ECI), a superfície do eletrodo de trabalho foi renovada por lavagem com água destilada.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata e em todo trabalho, os resultados apresentados equivalem à média aritmética dessas medidas.

3.3.2 Procedimento de Deconvolução

Um procedimento matemático de deconvolução, para a separação dos picos, foi realizado mediante o uso do software Microcal Origin[®] (versão 6.0). Para este processo, inicialmente, ajustou-se a linha base dos voltamogramas e, a seguir, determinou-se a quantidade de picos, largura do pico a meia altura. Após esta etapa foi fixado, o potencial de pico de cada fluoroquinolona separadamente, para à posterior aplicação da análise gaussiana, que resulta na obtenção de picos deconvoluídos.

3.3.3 Determinação de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina

As amostras de urina humana e bovina foram coletadas a partir de um indivíduo saudável (por seu consentimento) e animal saudável. As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e enriquecidas com LEVO e NOR em concentrações de 50,00, 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Antes do uso, as amostras foram coletadas em frascos de vidro e armazenados sob refrigeração. Para a análise dos picos de oxidação das amostras de interesse por teste de recuperação, alíquotas contendo 3,00 mL de amostra de urina foram tratadas com 0,20 mL de metanol para precipitação da proteína. Depois de se agitar durante cerca de 20 s, a proteína precipitada foi separada por centrifugação durante 30 min a 2800 rpm (força centrífuga relativa = 1,575). Alíquotas apropriadas do sobrenadante: 80 40 e 20 μL com, respectiva concentração de: 50,00, 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram adicionadas à célula eletroquímica contendo 5,00 mL de uma solução tampão BR (pH 5,0), para análise utilizando ECV e alíquotas semelhantes foi adicionada a uma célula eletroquímica contendo 10,00 ml de solução tampão BR (pH5,0), para analise utilizado ECI, ambas as células eletroquímicas foram submetidas à agitação por 10 segundos, com nitrogênio. Os voltamogramas VOQ

foram registrados seguindo as condições experimentais e instrumentais otimizadas. Nesse caso, a preparação da amostra e o passo de diluição em conjunção com o uso de surfactante, em concentração adequada, são indispensáveis para evitar os efeitos da matriz, devido à diversidade de espécies interferentes presentes nas amostras biológicas. Em seguida, a quantificação do LEVO e NOR nas amostras analisadas foi realizada aplicando o método de adição padrão, as quais foram realizadas em triplicatas.

3.3.4 Determinação de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas

Comprimidos contendo 500 mg de LEVO e comprimidos contendo 400 mg de NOR foram pesados e a massa média por comprimido foi determinada. A quantidade do pó equivalente a 0,3661 mg ($\pm 0,001$ mg) de LEVO e 0,2641 mg de ($\pm 0,001$ mg) de NOR, foi transferido para balões volumétricos de 250 mL contendo os solventes apropriados (secção 3.1.2) o procedimento de dissolução foi realizado com auxílio do banho de ultrassom durante 30 min. Logo após, o volume foi completado com água purificada ($R \geq 18,2 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$). Antes da utilização, os excipientes insolúveis foram separados das soluções por centrifugação durante 30 min a 2800 rpm. A concentração desejada de ambos os fármacos foi obtida por diluição da solução preparada para uma célula eletroquímica contendo eletrólito de suporte. Os voltamogramas foram registrados e o conteúdo do medicamento na forma de comprimidos foi determinado através do método de adição padrão realizado em triplicata.

3.3.5 Experimentos Espectrofotométricos

Os experimentos espectrofotométricos foram realizados com objetivo de obter uma comparação dos resultados encontrados a partir da metodologia eletroanalítica proposta neste trabalho. A absorbância das soluções das fluoroquinolonas foram medidas de forma individual em comprimentos de ondas de 290,03 nm para análise individual de LEVO e 277,94 nm para análise de NOR. Para tal, utilizou como branco a mistura de água e metanol (7:3, v/v), para a análise da LEVO, e água contendo 5,0 % de ácido acético, para a análise da NOR. As quantificações individuais foram realizadas pelo método de adição de padrão para as amostras de urina e formulações farmacêuticas, as mesmas foram preparadas de modo similar (secção 3.3.3 e 3.3.4).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

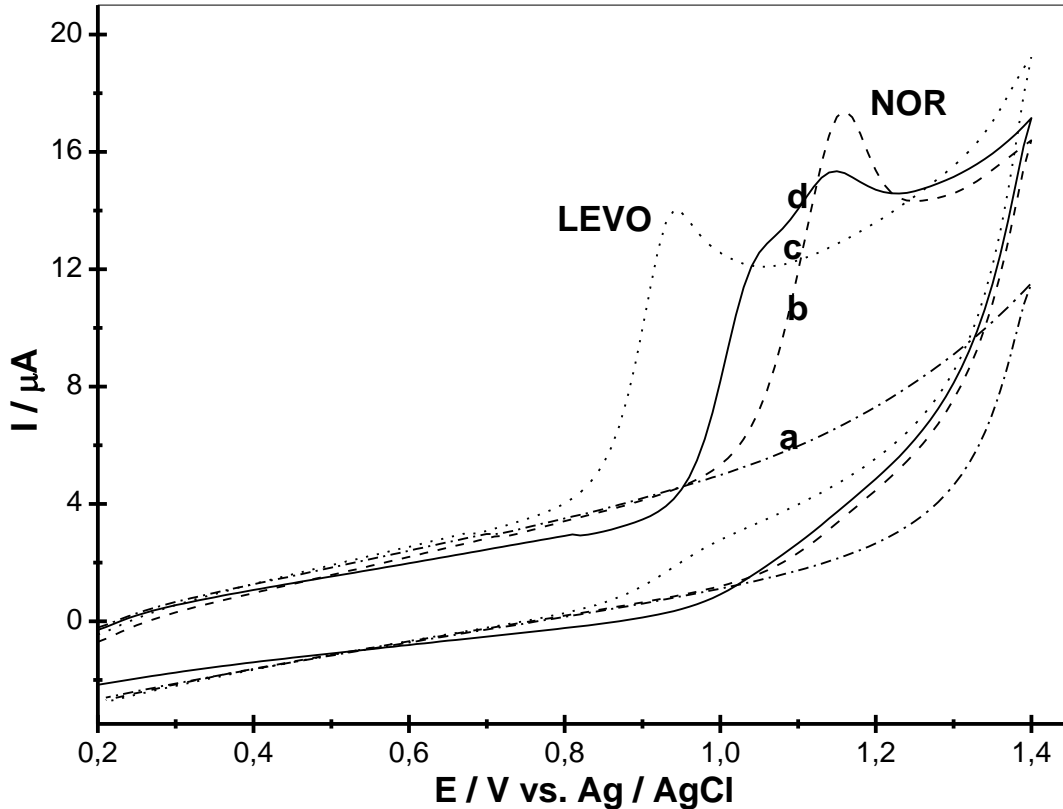
4.1 Desenvolvimento de Metodologia I – Determinação de LEVO e NOR utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo (ECV)

4.1.1 Estudos do comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas LEVO e NOR

Inicialmente, estudou-se o comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas levofloxacina (LEVO) e norfloxacina (NOR) sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV), empregando tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0 como eletrólito suporte. Na Figura 4 são apresentados os voltamogramas cíclicos registrados após varredura de potencial na direção positiva de 0,20 a 1,40 V vs. Ag/AgCl a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Para o branco e as respectivas adições de fluoroquinolonas à célula eletroquímica. Como pode ser observado, LEVO e NOR, exibem um pico de oxidação em potencial de 0,95 V (Figura 4c) e 1,10 V (Figura 4b), respectivamente, quando analisadas individualmente.

Para a análise simultânea de ambas as fluoroquinolonas verifica-se, na Figura 4d, um pico com potencial de 1,04 V atribuído a oxidação da LEVO e um segundo pico com potencial de 1,14 V, atribuído a oxidação da NOR. Ademais, pode ser observado nos voltamogramas da Figura 4, que as fluoroquinolonas LEVO e NOR exibem apenas picos de oxidação, sem a ocorrência de picos na varredura reversa, esse comportamento voltamétrico é indicativo de um processo de transferência eletrônica irreversível. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura [46, 49], para estudos eletroquímicos envolvendo ambas as fluoroquinolonas, em que os autores apontam que o processo de oxidação ocorre no grupo piperazinil presente nessas moléculas.

Figura 4 - Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de LEVO e NOR sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00 (a) Eletrólito de suporte; (b) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR; (c) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO; (d) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR e $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: próprio autor

4.1.2 Estudos utilizando diferentes técnicas voltamétricas

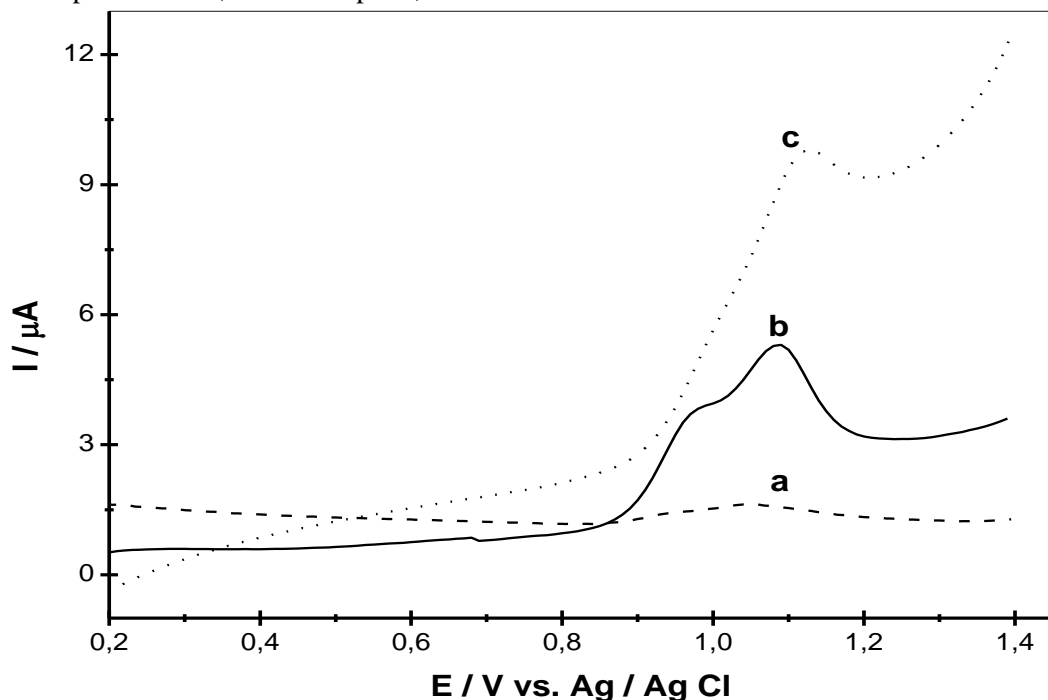
Para este estudo, investigou-se a oxidação eletroquímica de LEVO e NOR sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, empregando as técnicas voltamétricas: voltametria de varredura linear (VVL), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Neste caso, o objetivo foi avaliar a detectabilidade destas técnicas, considerando os diferentes modos de perturbação do eletrodo de trabalho, visando selecionar uma técnica para o desenvolvimento da metodologia para a detecção simultânea de LEVO e NOR. Na Figura 5 são apresentados os voltamogramas obtidos com o uso das diferentes técnicas voltamétricas.

A técnica de VOQ (Figura 5 b) gerou voltamograma com melhor perfil voltamétrico, uma vez que os picos correspondentes à oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas foram, ligeiramente, resolvidos. Por outro lado, o voltamograma obtido empregando a técnica VVL

(Figura 5 c), não apresentou um perfil voltamétrico satisfatório, cujos picos observados para a detecção das fluoroquinolonas não foram nitidamente definidos. Ademais houve um comprometimento do perfil voltamétrico, acarretando em um ligeiro aumento da linha base e uma resolução voltamétrica insuficiente. No voltamograma obtido com a técnica de VPD (Figura 5 a), pode-se perceber que não houve a ocorrência de picos de oxidação, indicando que nas condições propostas, a técnica não apresenta detectabilidade satisfatória. Assim, considerando que o voltamograma obtido com a técnica de VOQ gerou resultados com melhor resolução voltamétrica e uma melhor discriminação do sinal de oxidação das fluoroquinolonas, esta foi escolhida para medidas posteriores e os parâmetros inerentes ao sistema foram avaliados.

Adicionalmente, a superioridade da técnica de VOQ frente às demais técnicas eletroquímicas pode ser resumida no uso de altas velocidades de varredura de potencial durante as medidas experimentais, possibilitando a obtenção de correntes de pico melhor definidas, melhorando a sensibilidade da mesma e alcançando limites de detecção da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ [57 e 84].

Figura 5 - Voltamogramas de pulso diferencial (a) ($v = 10$ mV s⁻¹, $E_{sw} = 10$ mV e $t_p = 10$ ms); onda quadrada (b) ($f = 10$ Hz, $E_{sw} = 10$ mV e $E_s = 2$ mV) e varredura linear (c) ($v = 100$ mV s⁻¹), registrados para a oxidação eletroquímica de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LEVO e NOR, sobre superfície de ECV em meio de tampão de BR $0,04$ mol L⁻¹ pH 7,0.

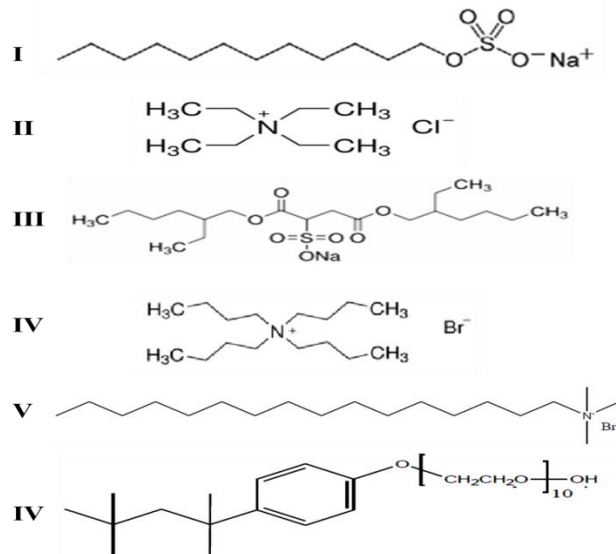


Fonte: próprio autor

4.1.3 Influência de surfactantes na resposta voltamétrica

Após a escolha da melhor técnica eletroanalítica para a detecção simultânea das fluoroquinolonas e com propósito de melhorar a sensibilidade na resposta eletroquímica bem como melhorar a separação dos picos das fluoroquinolonas, diferentes surfactantes, catiônico, aniônico e neutro foram utilizados. De acordo com preconizado na literatura [66-72,77,78], o uso de surfactantes tem proporcionado resultados satisfatórios em termos de intensidade de corrente e separação do sinal eletroquímico. Além disso, há relatos de diminuição do efeito de matriz e aumento da solubilidade do analito de interesse na presença do tensoativo. Assim sendo, o efeito da adição de diferentes surfactantes (Figura 6) foi avaliado, registrando voltamogramas de onda quadrada em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0.

Figura 6 - Estrutura química dos surfactantes: I- Lauril sulfato de sódio (LSS), II- cloreto de tetraetilamônio (CTMA), III- dioctil sulfocinato de sódio (DSS), IV- brometo de tetrabutilamônio (BTBA), V- brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA), VI- Triton X-100 (TX-100).

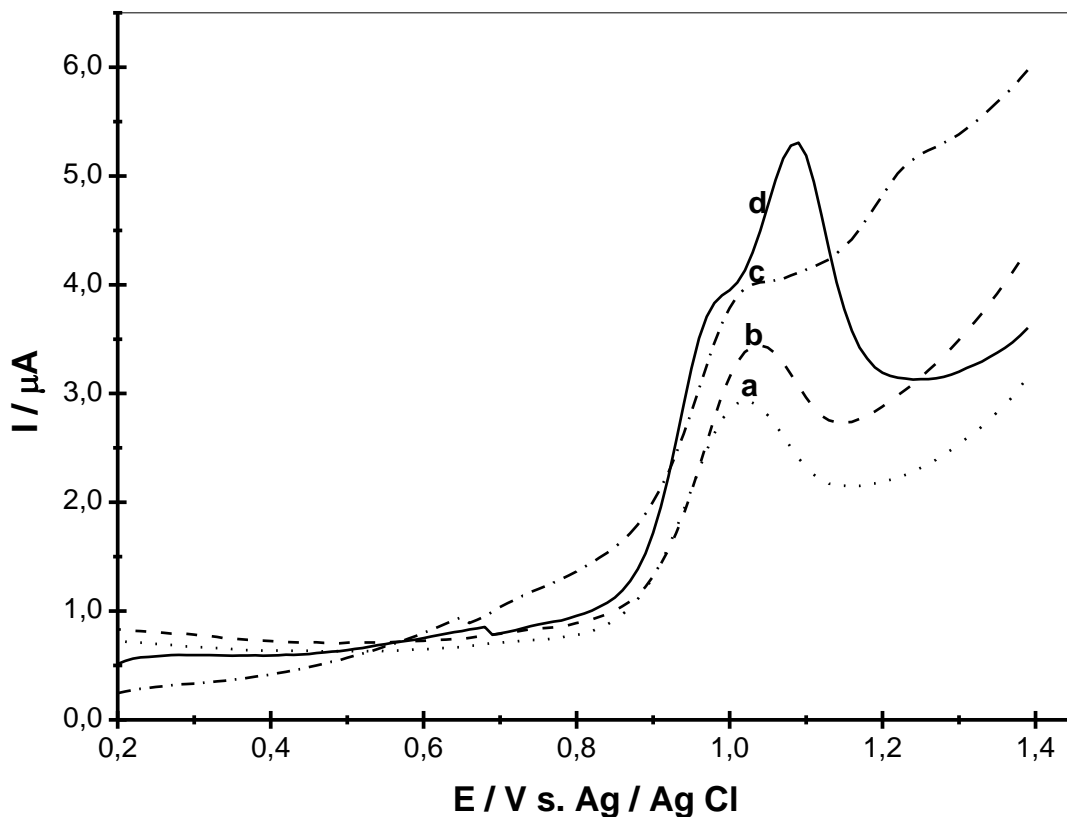


Fonte: próprio autor

Na Figura 7, são apresentados os voltamogramas de onda quadrada registrados para oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas na presença dos surfactantes catiônicos CTMA (b), BTAB (c) e BCTA (d). Como observado na Figura 7, os voltamogramas registrados na presença dos surfactantes catiônicos, CTMA (Figura 7 voltamograma b) e BCTA (Figura 7 voltamograma c), são caracterizados por uma sobreposição dos picos de oxidação das espécies eletroativas de interesse. Neste caso, não há uma resolução satisfatória para a separação dos picos, uma vez que não é possível distinguir os picos de oxidação das

fluoroquinolonas, LEVO e NOR. Todavia, a análise do voltamograma obtido para oxidação das fluoroquinolonas na presença do surfactante BCTA (Figura 7 voltamograma d) permite observar que, mesmo verificando a ocorrência de dois picos, os mesmos não apresentaram um perfil voltamétrico satisfatório devido à baixa intensidade de corrente e uma má definição da linha base.

Figura 7 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes catiônicos: (a) ausência de surfactante, (b) CTMA, (c) BTAB, (d) BCTA, para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR sobre superfície de ECV em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

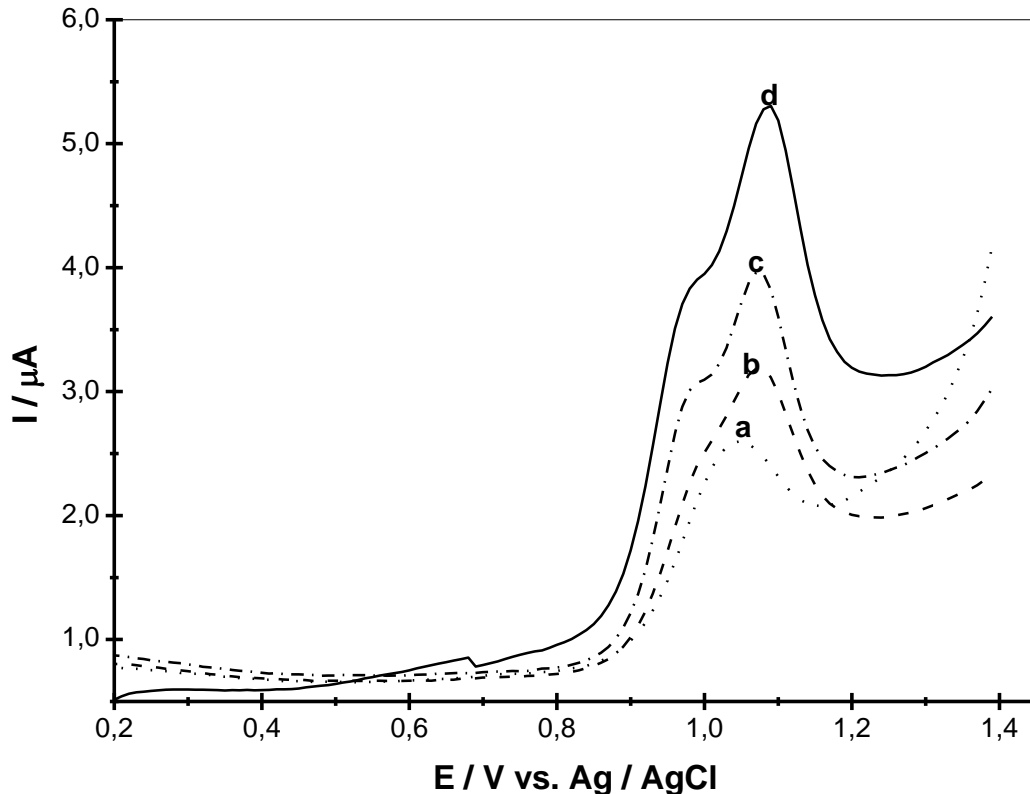
Para contornar tais problemas, avaliou-se, a seguir, a influência dos surfactantes: neutro TX-100 (Figura 8, voltamograma a) e aniônicos: DSS (Figura 8, voltamograma b) e LSS (Figura 8, voltamograma d) na oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas, LEVO e NOR. Novamente, observa-se na Figura 8, que na presença do surfactante neutro TX-100 (voltamograma a) não há qualquer alteração satisfatória nos potenciais de pico tampouco aumento considerável na corrente de pico. Todavia, com a adição dos surfactantes aniônicos DSS (voltamograma b) e LSS (voltamograma d), observa-se um ligeiro aumento na

intensidade da corrente de pico bem como a resolução dos dois picos. Entretanto, mesmo não proporcionando uma separação satisfatória para os picos de oxidação de ambas as fluoroquinolonas, apenas na presença do surfactante LSS (Figura 8, voltamograma d) foi possível observar, nitidamente, a ocorrência de dois picos, além do aumento na intensidade do sinal.

De acordo com os resultados obtidos para detecção das fluoroquinolonas, NOR e LEVO, o surfactante escolhido para estudos futuros foi o surfactante aniônico LSS, pois com a adição deste, houve um ganho considerável na intensidade da corrente de pico. Ademais, a adição do surfactante aniônico LSS, durante análise simultânea, propiciou um deslocamento entre o potencial de oxidação das fluoroquinolonas, permitindo maior discriminação entre os dois picos detectados para ambos os analitos.

De acordo com o preconizado na literatura, é conhecido que os surfactantes podem adsorver espontaneamente na superfície de diferentes eletrodos de trabalho, tais como: eletrodos de pasta de carbono (EPC), eletrodos de carbono vítreo (ECV) e eletrodos de carbono impressos (ECIs) via interações hidrofóbicas para formar uma camada adsorvida de surfactante na superfície eletródica [60, 66-72]. Este fenômeno pode contribuir para um melhor arranjo/disposição do analito na superfície eletródica, modificada pela formação do filme de surfactante, cujo efeito pode minimizar problemas de adsorção irreversível do produto eletrogerado, melhora na velocidade de transferência de elétrons bem como decréscimo do sobrepotencial necessário para ocorrer à reação eletroquímica. Portanto, a melhora na resposta da corrente de pico para oxidação das fluoroquinolonas acompanhada de um considerável deslocamento do potencial, provavelmente, está associada à interação surfactante/eletrodo que contribui para minimizar ou suprimir a passivação da superfície eletródica bem como auxiliar na transferência eletrônica desses analitos na superfície modificada pelo surfactante.

Figura 8 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes neutro: (a) TX-100 e aniônicos: (b) DDS, (c) ausência de surfactante, (d) LSS, para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR sobre superfície de ECV em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

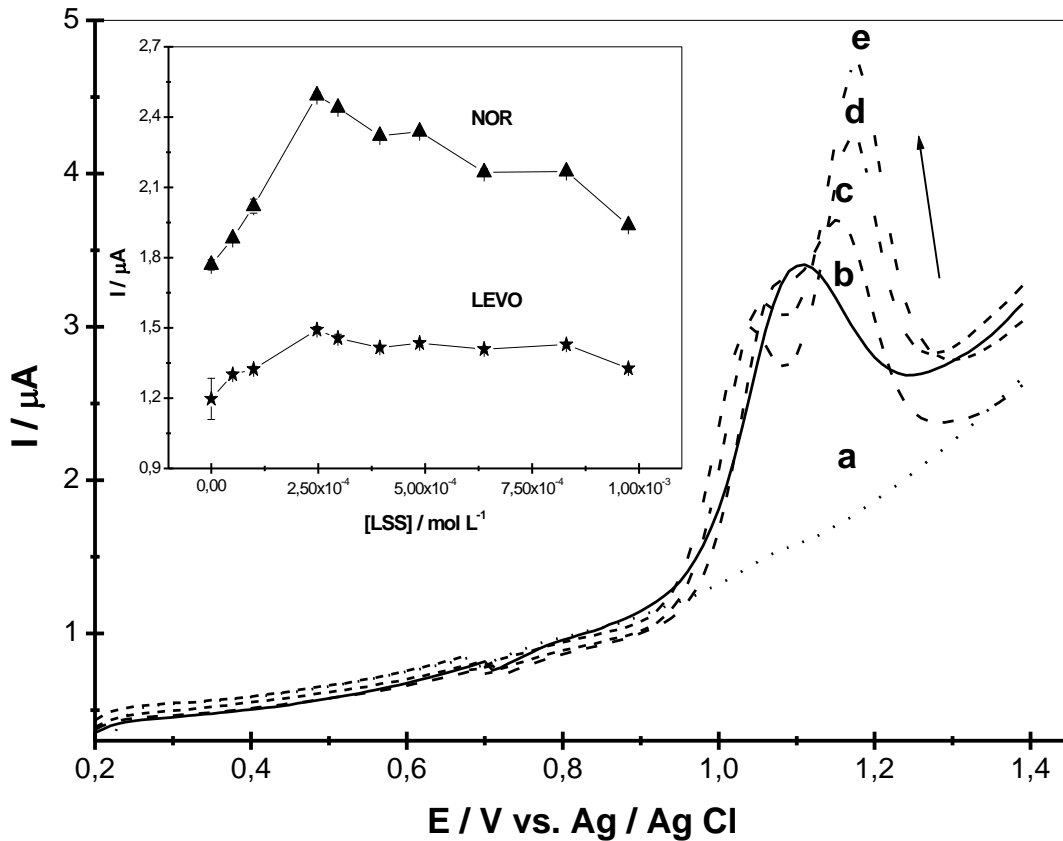
A influência da concentração do surfactante LSS no comportamento voltamétrico de LEVO e NOR foi investigada testando-se intervalo de concentração entre $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $9,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ monitorando-se a oxidação simultânea de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada fluoroquinolona em meio de tampão BR pH 7,0, os resultados são apresentados na Figura 9. O aumento da concentração do surfactante LSS na célula eletroquímica promove significativo aumento na intensidade da corrente de pico de ambas as fluoroquinolonas até concentração abaixo de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em níveis de concentrações superiores a de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a intensidade da corrente de pico sofre uma diminuição significativa, acompanhada de uma baixa resolução voltamétrica em maiores concentrações do LSS.

A adição do surfactante aniônico LSS em solução contendo $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR promove um deslocamento significativo dos picos de oxidação para região de maior potencial. Entretanto, esse deslocamento não comprometeu a definição da linha de base pela proximidade com a oxidação do próprio eletrólito.

Em concentrações de surfactante abaixo da concentração micelar crítica os mesmos encontram-se como monômero e as interações ocorridas entre o analito/surfactante pode ser predominantemente eletrostáticas [59]. No entanto, devido ao fato de que uma grande quantidade de íons de carga oposta à do surfactante estarem em solução eletrolítica, estes se tornam parte das micelas formadas. Desta forma, pode ocorrer uma redução no número de espécies disponíveis para o transporte de corrente elétrica, bem como na carga total dos agregados micelares para interação com o analito de interesse. Sendo assim, em estudos eletroquímicos envolvendo interações analito/surfactante torna-se importante monitorar a CMC, uma vez que, a partir desse ponto a presença do surfactante pode não promover efeitos esperados, afetando diretamente o coeficiente de difusão da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.

Analisando a Figura 9 é possível observar que o aumento da concentração do surfactante acima de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pode ter excedido a concentração micelar crítica e, por conseguinte, a formação de agregados micelares torna-se dominante. Assim, os agregados micelares formados a partir da concentração micelar crítica atuam somente na solubilidade dos analitos levando a uma ligeira diminuição da corrente de pico. Portanto a concentração do surfactante próxima a $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi adotada como sendo ideal para monitorar a detecção das fluoroquinolonas LEVO e NOR sobre superfície do ECV visando desenvolvimento de um método eletroanalítico.

Figura 9 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactante LSS para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR e $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO sobre superfície de ECV em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. (a) Eletrólito de suporte, (b) ausência de LSS, (c) na presença de $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS, (d) na presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS, (e) na presença de $9,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LSS. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

4.1.4 Influência do pH do eletrólito suporte

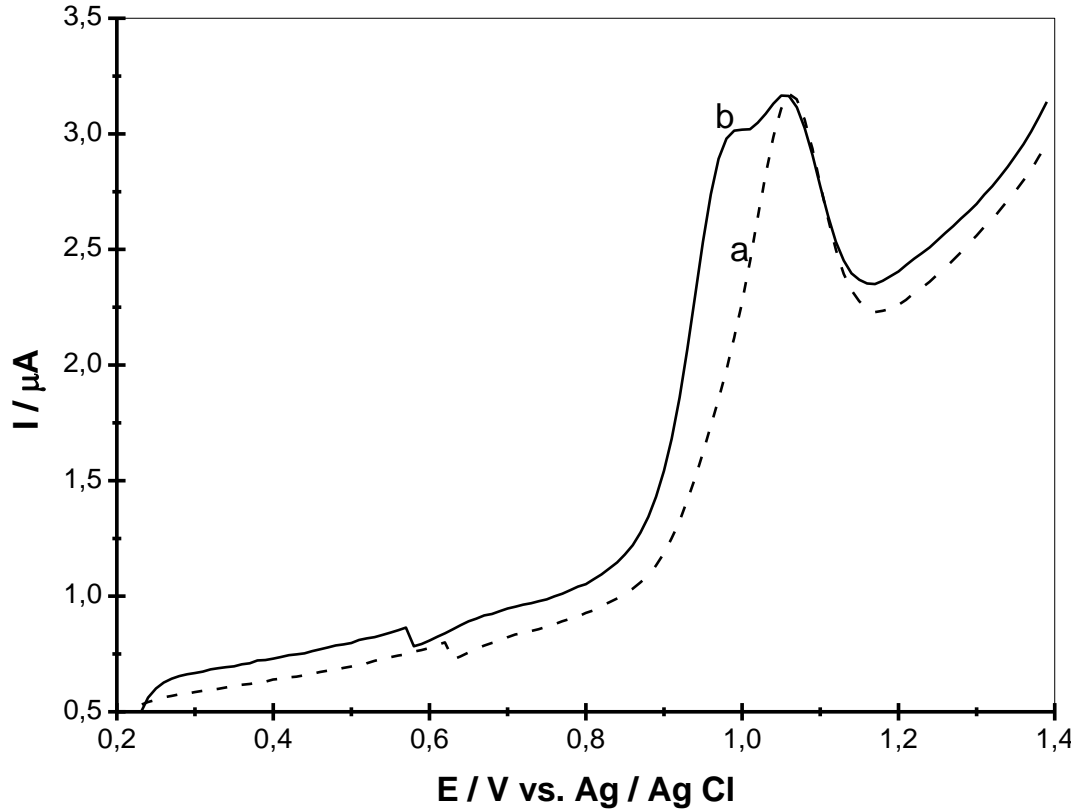
O eletrólito suporte é uma solução preparada pela mistura de substâncias iônicas cuja concentração, tipicamente, situa-se entre 50 a 100 vezes maior que as demais espécies na célula eletroquímica. O eletrólito suporte deve ser inerte, não reagir com a espécie eletroativa e/ou nenhum de seus subprodutos na janela de potencial do eletrodo de trabalho, na qual os estudos com o analito de interesse são realizados. É importante salientar que tipos diferentes de eletrólito podem afetar diferentemente as condições da reação eletródica, afetando o mecanismo da interação entre a superfície do eletrodo e por consequência a resposta voltamétrica [85]. Sendo assim, o objetivo desta etapa de otimização foi encontrar o melhor eletrólito suporte visando obter um sinal eletroquímico relevante da oxidação das fluoroquinolonas em questão. Estabeleceu-se como características para escolha do melhor eletrólito correntes faradaicas estáveis e de maior intensidade para as fluoroquinolonas. Além

disso, o aparecimento no voltamograma de picos bem definidos e com deslocamento de potencial para regiões menos positivas foi fator relevante na comparação dos resultados.

Para a escolha do melhor eletrólito suporte, diferentes tampões com diferentes composições foram testados, o tampão fosfato na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e o tampão Britton-Robinson na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (ambos em pH 7,0). A Figura 10 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estudo desses dois tampões. De acordo com estes voltamogramas, observa-se que a definição do pico de oxidação de ambas as fluoroquinolonas, LEVO e NOR, analisadas simultaneamente em tampão fosfato foi comprometida (Figura 10 voltamograma a), devido à sobreposição dos potenciais de oxidação e, conseqüentemente, baixa resolução voltamétrica. Para o estudo na presença do tampão BR (Figura 10 voltamograma b), mesmo não havendo separação satisfatória, é possível detectar nitidamente a ocorrência de dois picos com diferença de potencial de aproximadamente $0,063 \text{ V}$. Assim, considerando-se os fatores descritos anteriormente, o eletrólito de suporte escolhido e adotado para análises posteriores foi o tampão BR.

No estudo seguinte verificou-se a possibilidade de utilização de um solvente orgânico, tal como metanol e etanol, na proporção de 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50 e 10,00 % para modificar a composição do eletrólito de suporte tampão aquoso. Em geral, a adição de solvente orgânico aumenta a solubilidade de analitos orgânicos, reduzindo a associação ou interação de compostos hidrofóbicos. A escolha deste parâmetro foi um compromisso entre intensidade de corrente de pico, resolução voltamétrica e reprodutibilidade. Considerando estes aspectos, o solvente orgânico que proporcionou melhor resposta voltamétrica foi o metanol na proporção de 0,50%, sendo esta adotada para estudos posteriores.

Figura 10 - Influência do eletrólito de suporte na intensidade da corrente de pico em VOQ para uma solução de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR em: (a) tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e (b) tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Na presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS sobre superfície de ECV. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

Na sequência, investigou-se a influência do pH na resposta voltamétrica analisando-se os parâmetros de corrente e potencial de pico na oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,50% de metanol e $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de surfactante LSS. A análise da Figura 11A revela que, para a LEVO o aumento nos valores de pH entre 3,0 e 5,0 promove um aumento na corrente de pico, a qual é mantida praticamente constante até pH 6,0 e para valores de pH acima de 6,0 há uma diminuição acentuada da corrente de pico, de modo, que praticamente desaparece em valores de pH maiores que 8,0.

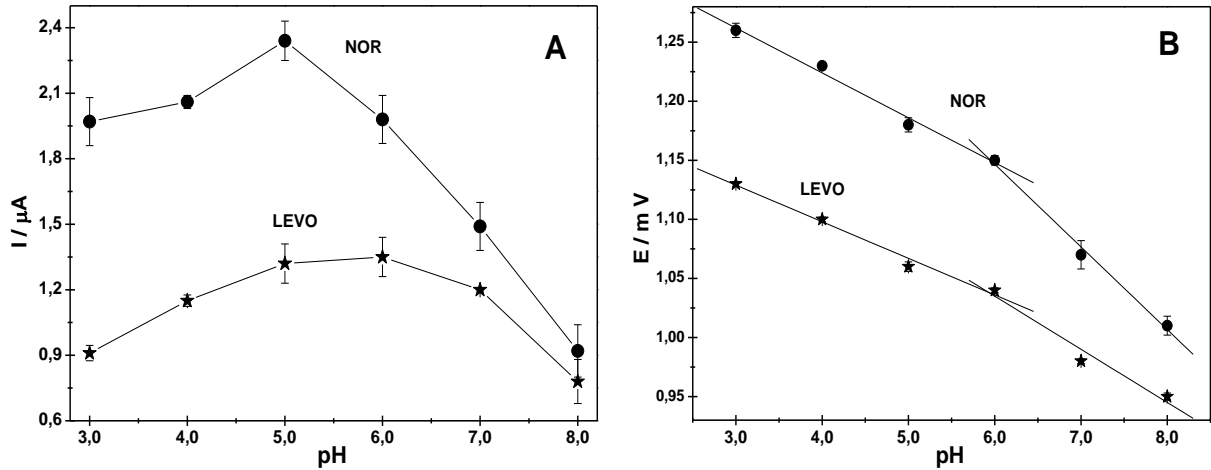
A influência do pH na resposta da corrente de pico da NOR também é mostrada na Figura 11A, na qual um máximo de corrente é obtido em um valor de pH igual a 5,0. Valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 6,0 promovem uma diminuição acentuada da corrente de pico, de modo que praticamente desaparece em valores de pH maiores que 8,0. O fato da corrente

de pico variar marcadamente em função do aumento do pH pode ser atribuído à existência de diferentes espécies iônicas (equilíbrio ácido-base) presentes em solução.

O comportamento voltamétrico, avaliado pelo estudo do pH, foi mais influenciado e nítido para a oxidação da NOR, o qual pode ser justificado pela presença de um grupo amina secundária (receptor de prótons) existente na posição 7 e a presença de um grupo carboxílico na posição 3 (doador de prótons) na estrutura dessa fluoroquinolona (Figura 2B). A presença desses grupos na estrutura da NOR torna-a uma substância diprótica em solução aquosa, existindo sob a forma de quatro microespécies, sendo elas: espécie positiva, espécie anfótero ou forma zwitteriônica, espécie neutra e espécie negativa. Estas espécies podem exercer maior influência no equilíbrio de protonação (ácido-base), de modo que as variações de pH alteram a densidade de carga da superfície e mobilidade desse analito no meio. O mesmo não ocorre com a LEVO, uma vez que esta apresenta na posição 7 de sua estrutura quinolônica o grupo substituinte amina terciária, não sendo facilmente protonada e, conseqüentemente, não havendo a formação das quatro microespécies em solução [86].

A influência da variação do pH no parâmetro voltamétrico de potencial de pico também foi investigado. Como pode ser visto na Figura 11 B, o potencial de pico desloca para valores menos positivos com o aumento do pH, indicando que mesmo na presença do surfactante o processo eletródico é influenciado por reações de protonação. Além disso, também foi observado intervalos lineares na Figura 11 B com pontos de intersecção em pH, aproximadamente, igual a 6,0 (Figura 11 B), os pontos de intersecção em um gráfico de potencial de pico versus pH refletem as mudanças na protonação das funções presentes na molécula e, portanto estão associados ao pKa do composto em estudo [87]. Sendo assim, o valor de intersecção no pH 6,0 pode ser adotado como sendo pKa para a dissociação do grupo carboxílico das fluoroquinolonas. Assim, a melhor condição para oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, sobre a superfície do ECV ocorre em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo 0,50% de metanol, de modo que esta condição foi escolhida para propósitos analíticos.

Figura 11 - Influência do pH na resposta da corrente de pico (A) e do potencial de pico (B) para oxidação eletroquímica de $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR sobre a superfície de ECV em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0 – 8,0) contendo 0,5% de metanol e $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de surfactante LSS. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

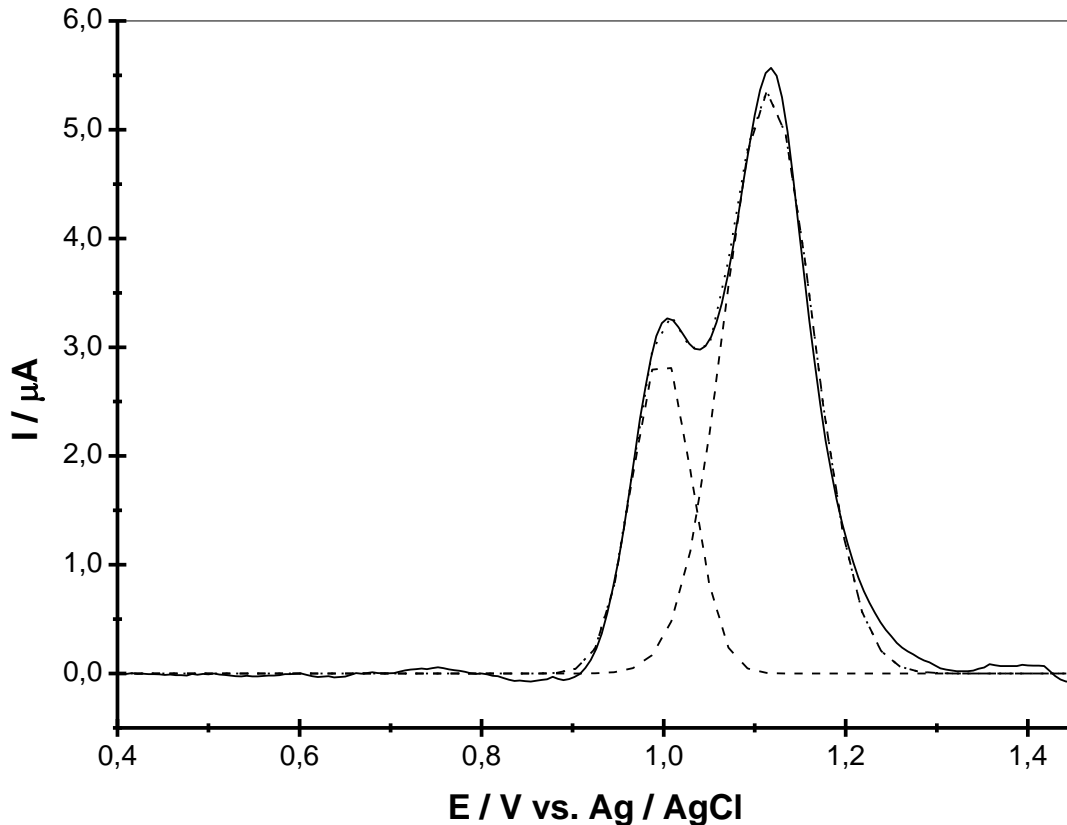
4.1.5 Deconvolução dos sinais voltamétricos da LEVO e NOR em análise simultâneas

A otimização de parâmetros experimentais, tais como, avaliação do melhor eletrólito suporte, pH da solução eletrolítica, tipo e concentração do surfactante, não promoveu uma separação satisfatória dos picos de oxidação de ambas as fluoroquinolonas. Assim, uma alternativa para determinação simultânea da LEVO e NOR foi à aplicação do procedimento de deconvolução. Devido à sobreposição dos picos de oxidação das fluoroquinolonas na determinação simultânea, ou seja, quando detectadas em uma mistura, foi necessário um procedimento matemático de deconvolução, para a separação satisfatória dos picos, o qual foi realizado mediante o uso do software Microcal Origin[®] (versão 6.0), que resultou nos picos de oxidação deconvoluídos (Figura 12).

Na Figura 12 é mostrado o voltamograma de onda quadrada obtido para a detecção simultânea de uma mistura das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, em que, após a aplicação do procedimento de deconvolução, verificou-se a separação satisfatória dos picos, os quais foram nomeados de picos deconvoluídos. O primeiro pico em 1,01 V é referente à oxidação da LEVO e o segundo pico em 1,12 V referente à oxidação da NOR. Na Figura 12, verifica-se ainda que, sem o procedimento de deconvolução, os sinais não são completamente resolvidos e a corrente de pico não pode ser medida com precisão e exatidão aceitável. No entanto, após a aplicação do procedimento de deconvolução, houve uma melhora significativa na resolução,

sendo possível obter voltamogramas com picos bem definidos, cujas medidas de intensidade de corrente, potencial de pico e área do pico dos analitos de interesse foram mais confiáveis.

Figura 12 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) na presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS para oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR analisadas simultaneamente sobre superfície de ECV. $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

Para comprovar a eficiência do método de deconvolução na separação de dois picos voltamétricos com processo eletroquímico energeticamente similar bem como verificar a existência de interferências provenientes de sobreposição desses sinais, realizou-se ainda, medidas voltamétricas, individuais e simultâneas, com os padrões de concentração conhecida de LEVO e NOR. Nesse caso, o pico voltamétrico das fluorquinolonas medido por meio do procedimento de deconvolução permitiu a obtenção de dados confiáveis e desvios relativos aceitáveis quando comparados com aqueles medidos individualmente (Tabela 2). Assim, a análise comparativa da intensidade de corrente, do potencial de pico e a área do pico, realizada para análise individual e simultânea de ambas as fluoroquinolonas, indica que não

há erros significativos e que o método de deconvolução pode ser uma alternativa satisfatória na separação de picos sobrepostos com processo eletródico energeticamente similar. Portanto, para a determinação simultânea de LEVO e NOR foi escolhido o surfactante LSS e o procedimento de deconvolução como alternativa de melhorar a resolução dos picos voltamétricos dessas fluoroquinolonas, sendo esta condição utilizada na otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais durante o desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas.

Tabela 2 - Comparação dos dados de medidas de NOR e LEVO ($5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) analisadas individual e simultaneamente sobre superfície de ECV em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) e presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS. Parâmetros da técnica de VOQ: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$.

Análise	Fluoro	Corrente/ $\mu\text{A} \pm \text{DPR}$	Potencial/ $\text{V} \pm \text{DPR}$	Área/ $\text{cm}^2 \pm \text{DPR}$
Individual	LEVO	$3,792 \pm 1,07$	$0,988 \pm 0,037$	$0,450 \pm 0,124$
Individual	NOR	$6,942 \pm 0,29$	$0,126 \pm 0,022$	$0,864 \pm 0,196$
Simultânea	LEVO	$3,368 \pm 1,14$	$1,003 \pm 0,007$	$0,431 \pm 0,122$
Simultânea	NOR	$6,765 \pm 1,01$	$1,122 \pm 0,0017$	$0,815 \pm 0,216$

4.1.6 Otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais

O estudo de um parâmetro instrumental é de fundamental importância para melhorar a detecção e a sensibilidade de um sistema eletroquímico em análise eletroanalítica, uma vez que a resposta das técnicas voltamétricas depende fortemente do sinal de excitação [56, 60]. A variação dos parâmetros da técnica de VOQ pode influenciar, significativamente, no sinal voltamétrico, como por exemplo, a amplitude (E_{sw}), que em baixos valores fornece picos estreitos e bem definidos. Posto isto, foram avaliados alguns parâmetros instrumentais e condições experimentais, levando em consideração a resolução voltamétrica, intensidade da corrente dos picos de oxidação das fluoroquinolonas, visando à obtenção da melhor condição de trabalho. A Tabela 3 apresenta o estudo das condições experimentais e instrumentais otimizadas para a detecção simultânea de LEVO e NOR sobre superfície ECV.

Tabela 3 - Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para o desenvolvimento do método eletroanalítico usando voltametria de onda quadrada e eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

Parâmetros	Tipo ou intervalo testado	Otimizados
Eletrólito suporte	Tampão: Fosfato e BR e solvente orgânico: etanol ou metanol	BR e 0,50% metanol
Surfactantes	LSS, CTMA, DSS, BTBA, BCTA e TX-100	LSS
Concentração do surfactante	$5,00 \times 10^{-5} - 9,75 \times 10^{-4}$ (mol L ⁻¹)	$2,47 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹
pH (tampão BR)	3,0 – 8,0	5,0
Frequência (<i>f</i>)	10 - 60 Hz	20 Hz
Incremento de potencial (<i>E_s</i>)	2,0 - 12 mV	6,0 mV
Amplitude (<i>E_{sw}</i>)	10 - 60 mV	30 mV
Tempo de equilíbrio	0 - 15 s	10 s

4.1.7 Curva analítica

Depois de estabelecida a melhor condição de trabalho para monitorar a oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, em meio de tampão BR 0,10 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo 0,5% de metanol e presença de LSS, voltamogramas de onda quadrada foram registrados em diferentes concentrações. A partir dos valores de corrente de pico foi construída a curva analítica, em que cada ponto representou a media de três medidas experimentais. Com base nos parâmetros apresentados na Tabela 4, calculou-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) da curva analítica usando o tratamento estatístico $3 \times \text{DP} / b$ e $10 \times \text{DP} / b$, respectivamente [88]. Nestas equações, **DP** representa o desvio padrão do intercepto e **b** a inclinação da curva de calibração.

Os LOD e LOQ obtidos (Tabela 4) revela que o sistema analítico de detecção apresenta detectabilidade adequada para os propósitos deste trabalho, de modo que pode ser empregado satisfatoriamente para a determinação simultânea das fluoroquinolonas LEVO e NOR.

Tabela 4 – Algumas figuras de mérito do método eletroanalítico para determinação simultânea de LEVO e NOR utilizando ECV nas condições otimizadas.

Parâmetros	LEVO	NOR
Intervalo linear (mol L ⁻¹)	$(2,00-20,00) \times 10^{-6}$	$(2,00-20,00) \times 10^{-6}$
Inclinação (µA)	$2,62 \times 10^{-1}$	$-9,13 \times 10^{-2}$
DP Inclinação	$9,19 \times 10^{-3}$	$3,78 \times 10^{-2}$
Intercepto (µA L µmol ⁻¹)	$9,28 \times 10^4$	$1,43 \times 10^5$
DP do intercepto	$5,18 \times 10^2$	$2,00 \times 10^3$
Coefficiente de correlação	0,9998	0,9992
LOD (mol L ⁻¹)	$2,97 \times 10^{-7}$	$7,90 \times 10^{-7}$
LOQ (mol L ⁻¹)	$9,89 \times 10^{-7}$	$2,63 \times 10^{-6}$

DP = desvio padrão.

4.1.8 Aplicação da metodologia desenvolvida

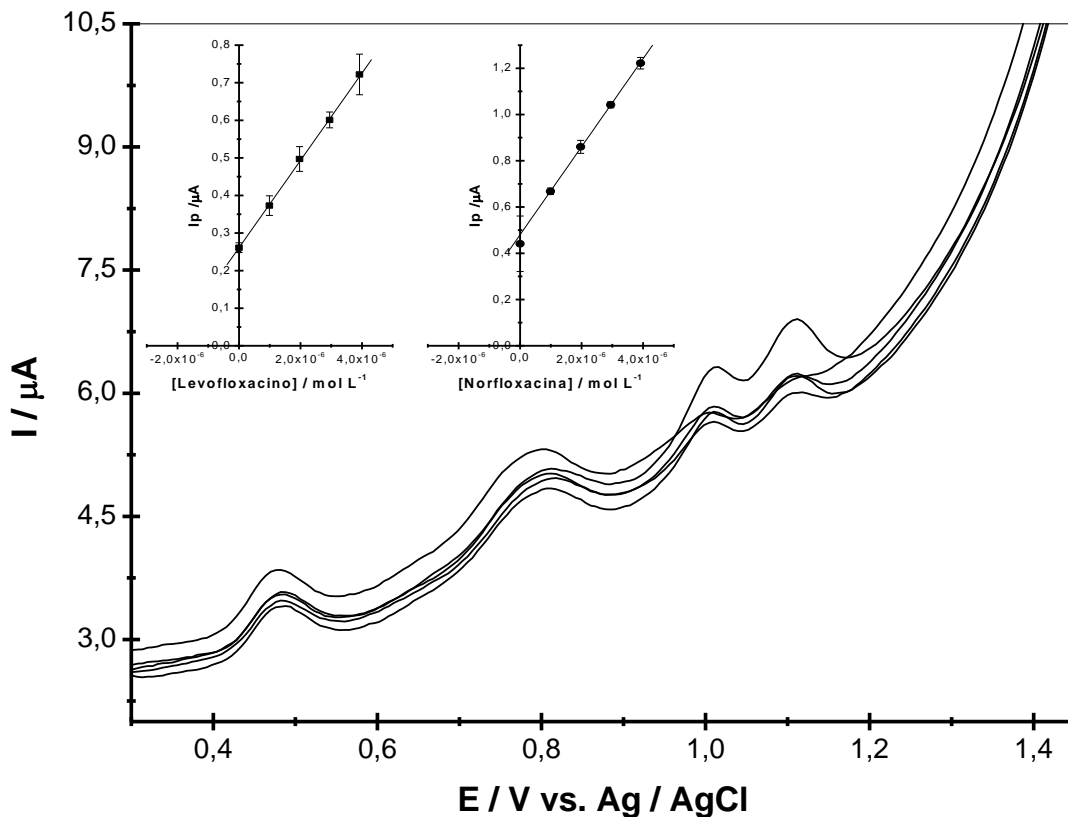
4.1.8.1 Determinação de LEVO e NOR em amostra de urina humana e bovina

Para verificar a viabilidade de aplicação da metodologia eletroanalítica na determinação simultânea das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, foi avaliado o efeito da matriz em amostras de urina humana e bovina mediante de medidas de adição e recuperação nessas matrizes. As amostras utilizadas para estas análises foram coletadas de indivíduos saudáveis, enriquecidas com os padrões das fluoroquinolonas como descrito na seção experimental 3.3.3 e analisadas por VOQ nas condições otimizadas, Tabela 4.

A Figura 13 mostra que o voltamograma de onda quadrada, após aplicação do procedimento de deconvolução, obtido para a determinação simultânea de LEVO e NOR em uma amostra de urina bovina, após o enriquecimento da mesma com 50 mg L⁻¹ de cada analito. Como pode ser observado no voltamograma da Figura 13, o perfil voltamétrico de LEVO e NOR não é afetado pelas espécies interferentes presentes na amostra biológica, uma vez que o voltamograma exibe dois picos de oxidação bem definidos, sendo notória a ausência do efeito de matriz.

A curva de adição de padrão mostrada na Figura 13 (Inserção) representa a média aritmética de três determinações analíticas, cujos dados obtidos para as amostras analisadas forneceram linearidade satisfatória, com coeficientes de correlação sempre próximos de 0,999. Estes resultados indicam que as determinações analíticas podem ser executadas com elevada confiabilidade, uma vez que as recuperações variaram entre 90,2% a 101,3% para LEVO e 88,1% a 107,5% para NOR. De acordo com estes resultados, infere-se que a metodologia eletroanalítica proposta associada ao procedimento de deconvolução, pode ser usada com sucesso para a quantificação simultânea de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina sem etapas rigorosas de pré-tratamento, pois não foi observado nenhum efeito de matriz.

Figura 13 - VOQ obtido para a oxidação eletroquímica e simultânea de LEVO e NOR sobre superfície do ECV em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 7,0) e presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS na presença de amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$. (Inserção) curva de adição de padrão para amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR e sucessivas adições de $1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ das fluoroquinolonas.



Fonte: próprio autor

Tabela 5 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão dos métodos proposto obtido para amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações de LEVO e NOR.

Amostras	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^[a] (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR (%)
LEVO				
Urina Humana	200	180 ± 22	90,2	4,8
	100	94 ± 28	94,0	7,0
	50	49 ± 9	99,0	7,3
Urina Bovina	200	187 ± 17	93,6	12,9
	100	101 ± 12	101,3	3,3
	50	51 ± 4	101,3	9,8
NOR				
Urina Humana	200	200 ± 38	100,2	7,7
	100	88 ± 18	88,1	14,2
	50	47 ± 12	94,4	11,2
Urina Bovina	200	185 ± 35	92,5	12,9
	100	95 ± 15	94,8	8,9
	50	54 ± 12	107,5	4,7

^[a] Média de três determinações ± intervalo de confiança (N = 3), t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade), DPR: desvio padrão relativo.

4.1.8.2 Determinação da LEVO e NOR em formulações farmacêuticas

O método proposto também foi empregado para a quantificação das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, em formulações farmacêuticas. Amostras de formulações farmacêuticas contendo as fluoroquinolonas de interesse foram analisadas utilizando o método de adição de padrão e os resultados foram comparados com os valores rotulado na embalagem, cujos resultados encontrados são apresentados na Tabela 6.

As curvas de adição de padrão foram lineares, com coeficientes de correlação sempre próximos a 0,999, demonstrando que, como esperado, os excipientes das formulações farmacêuticas não interferiram nas análises de quantificação, sendo os efeitos de matriz ausentes nessas amostras. Ademais, como pode ser observado na Tabela 6, os resultados

obtidos revelam precisão satisfatória para o método proposto, uma vez que os valores encontrados foram próximos aos valores rotulado, demonstrando que o método proposto é uma alternativa aceitável para determinação eletroanalítica de LEVO e NOR em formulações de produtos farmacêuticos que contenham essas fluoroquiolonas.

Tabela 6 - Determinação quantitativa de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.

Amostra	Valor rotulado (mg)	Encontrado (mg) ^[a]	DPR (%)	Erro relativo (%)
Levofloxacina	500	500 ± 39	3,2	0,07
Norfloxacina	400	401 ± 38	3,8	0,17

^[a] Os resultados apresentados em forma de intervalo médio ± valor de confiança (N = 3) , t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade)

4.2 Desenvolvimento de Metodologia II – Determinação de LEVO e NOR utilizando eletrodos de carbono impressos (ECI)

4.2.1 Estudos do comportamento voltamétrico da LEVO e NOR

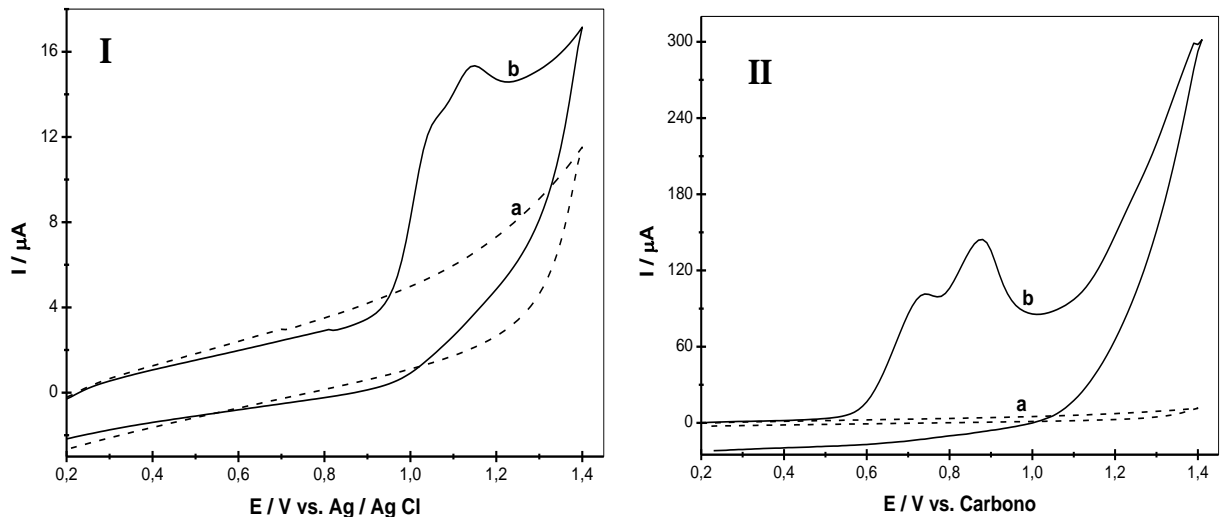
A oxidação eletroquímica das fluoroquinolonas LEVO e NOR foi realizada comparando o perfil voltamétrico registrado sobre a superfície dos eletrodos de carbono impressos (ECI) e de carbono vítreo (ECV), Figura 14 (I e II). A Figura 14 (I) reúne os voltamogramas obtidos sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,0), cujo voltamograma é caracterizado por um pico em, aproximadamente, 1,04 V, atribuído a oxidação da LEVO e um segundo pico em 1,14 V referente a oxidação da NOR. Adicionalmente, não é possível observar a ocorrência do pico catódico na varredura reversa (Figura 14 I), indicando que o processo eletroquímico ocorre por transferência eletrônica irreversível. Entretanto, ambos os picos não são satisfatoriamente separados, apresentando potenciais de oxidação muito próximos, de maneira que a identificação fica comprometida. Além disso, estes picos ocorrem próximos à oxidação do próprio eletrólito, causando distorções significativas no perfil voltamétrico o que também compromete a distinção precisa e exata entre os picos de ambas as fluoroquinolonas.

Para contornar os problemas supracitados, o comportamento voltamétrico de ambas as fluoroquinolonas também foi avaliado registrando voltamogramas sobre a superfície de ECI. Na Figura 14 II, são apresentados os voltamogramas cíclicos registrados para o branco (Figura 14 IIa) e para a oxidação eletroquímica de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LEVO e NOR (Figura 14 IIb). Um pico anódico com potencial de 0,73 V referente à oxidação de LEVO e outro pico em 0,87 V referente à oxidação da NOR, sem os correspondentes picos na varredura reversa, são observados para o comportamento voltamétrico estudado sobre a superfície do ECI (Figura 14 IIb). Comparando a oxidação eletroquímica da LEVO e NOR nesta condição e sob influência desses dois materiais eletródicos, verifica-se que o perfil voltamétrico é melhor definido no ECI com uma ligeira diminuição da corrente residual, uma melhor definição da linha base e um significativo deslocamento de pico para um valor menos positivo. Este deslocamento de potencial (Figura 14 II), pode ser atribuído ao pseudo-referência, cuja superfície é desprotegida, que constituem o conjunto de eletrodos da tinta de carbono impressa sobre o material cerâmico.

O deslocamento de potencial de pico para voltamogramas obtidos sobre a superfície de ECI também foi observado por Bergamini e colaboradores [75], os quais concluíram que este deslocamento de potencial, deve-se ao “pseudo” referência de tinta de carbono. De acordo com os autores, este comportamento foi confirmado por medidas voltamétricas realizadas sobre a superfície do ECI, comparando os resultados obtidos após troca do eletrodo de referência convencional de Ag/AgCl [75]. Assim, os ECI mostram-se bastante atraentes e promissores para a utilização em detecções eletroanalíticas, pois problemas de contaminação da superfície por adsorção podem ser facilmente contornados pelos descartes desses eletrodos após certo período de uso ou por modificação de sua superfície mediante uso de surfactantes.

Finalmente, comparando os voltamogramas da Figura 14, observa-se várias vantagens com o uso desse tipo de eletrodo, as quais podem se aliar a portabilidade, a simplicidade de operação e, principalmente, pelo arranjo instrumental. Este arranjo permite compor os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência impressos diretamente sobre uma mesma superfície polimérica, permitindo fácil adaptação a uma variedade de sistemas eletroanalíticos bem como possibilidade de utilização em análises *in loco*.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos registrados para a oxidação eletroquímica de LEVO e NOR sobre superfície de ECV (A) e ECI (B), em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0 (a) Eletrólito suporte; (b) 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de LEVO e NOR. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

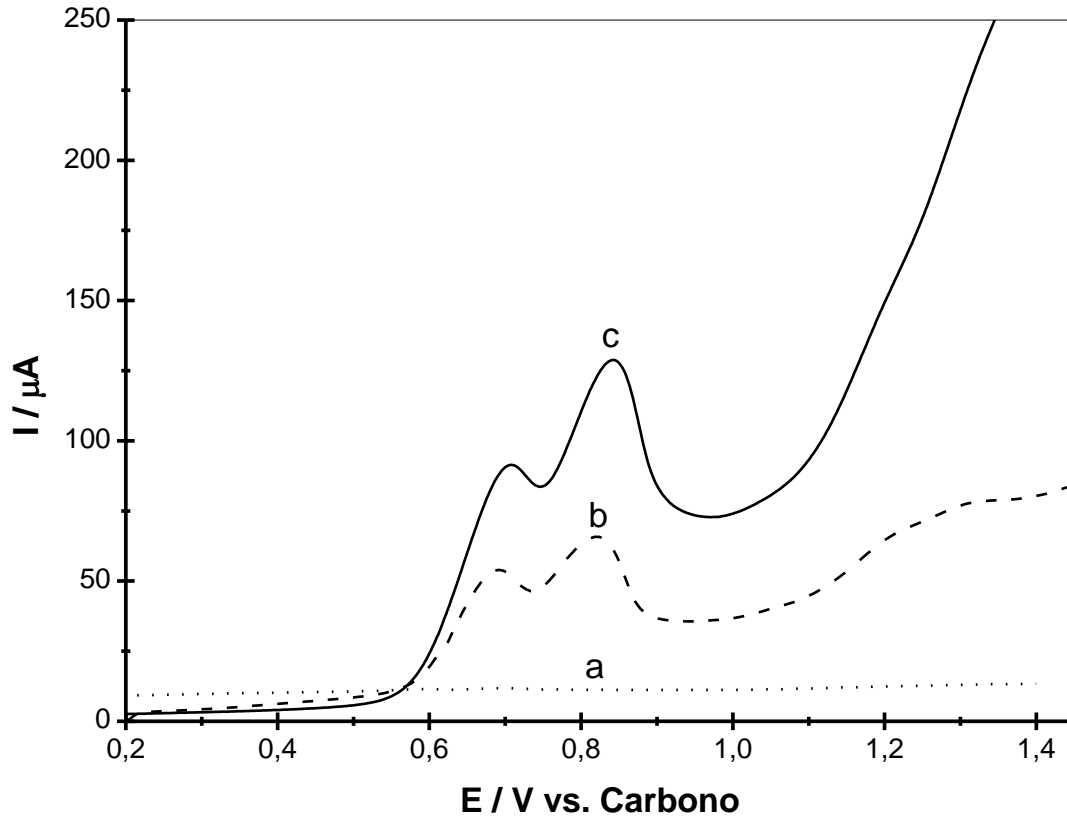


Fonte: próprio autor

4.2.2 Estudos utilizando diferentes técnicas voltamétricas

O comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas também foi investigado sobre a superfície do ECI, utilizando outros modos de varredura com objetivo de melhorar a detectabilidade das técnicas eletroquímicas e também baixar os limites de detecção. Assim, as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de varredura linear (VVL) foram testadas com o objetivo de comparar a intensidade dos sinais e a resolução voltamétrica durante o desenvolvimento de métodos analíticos. Analisando os voltamogramas obtidos para a oxidação eletroquímica de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LEVO e NOR em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0 pelas técnicas de VVL, VOQ e VPD, observa-se que as técnicas de VPD e VOQ apresentaram picos de oxidação bem definidos para as fluoroquinolonas, como mostra a Figura 15. A comparação da intensidade do pico obtido pela técnica de VOQ (Figura 15, voltamograma c) revela que este é mais intenso que o obtido pela técnica de VPD (Figura 15, voltamograma b), e ainda mais intenso do que o obtido pela técnica de VVL (Figura 15, voltamograma a). Assim sendo, a técnica de VOQ foi escolhida para medidas posteriores e os parâmetros inerentes ao sistema foram avaliados. A superioridade desta técnica como foi discutida na Metodologia I pode ser resumida ao fato da velocidade de varredura ser efetivamente mais alta que as demais técnicas, sendo que as reações químicas paralelas influenciam menos no processo eletródico e, assim, o sinal na componente da corrente inversa pode ser mais facilmente observado [57].

Figura 15 - Voltamogramas de varredura linear (a) ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $t_p = 10 \text{ ms}$); pulso diferencial (b) ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) e onda quadrada (c) ($f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $E_s = 2 \text{ mV}$), registrados para a oxidação eletroquímica de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR, sobre superfície de ECI em meio de tampão de BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0.



Fonte: próprio autor

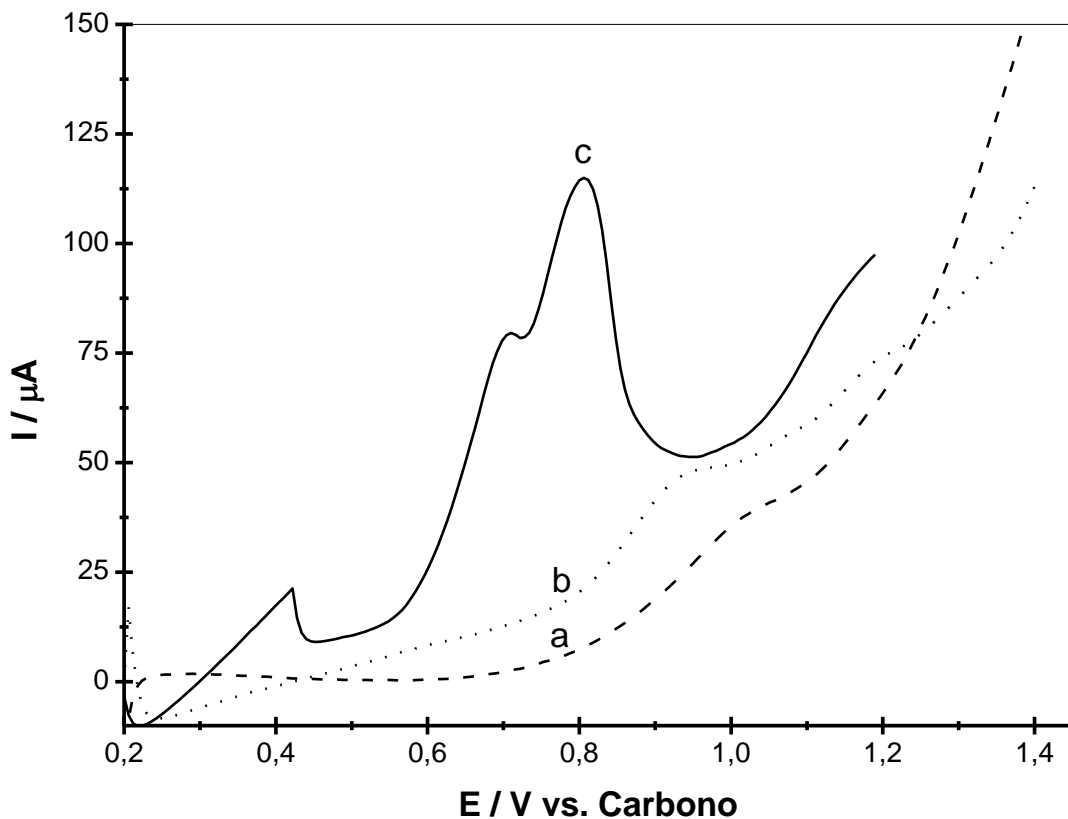
4.2.3 - Influência do surfactante

Com o intuito de melhorar a detectabilidade e a resolução dos picos de oxidação das fluoroquinolonas LEVO e NOR na superfície do ECI e, ao mesmo tempo, aumentar vida útil desses eletrodos, empregou-se como principal alternativa o uso de surfactante. Levando em consideração que o uso de surfactantes pode minimizar ou até suprimir a inativação da superfície eletródica gerada pela adsorção de produtos eletrogerados ou até mesmo do próprio reagente [66-69], realizou-se testes com a presença dos surfactantes aniônicos DSS, LSS e do surfactante catiônico BCTA, pois estes foram os que melhor proporcionaram melhores resultados no desenvolvimento da Metodologia I.

Assim, o estudo da influência dos surfactantes DSS, BCTA e LSS na oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR revela que os surfactantes DSS (Figura 16, voltamograma a) e BCTA (Figura 16, voltamograma b) apresentam uma baixa resolução

dos picos de oxidação das espécies eletroativas, além de não ocasionar um aumento considerável na intensidade da corrente de pico. Todavia, o voltamograma registrado para a oxidação das fluoroquinolonas na presença do surfactante LSS (Figura 16, voltamograma c) evidencia que este surfactante promoveu modificação considerável no perfil voltamétrico. Portanto, comparando-se os voltamogramas da Figura 16, verifica-se claramente que a presença do LSS foi o que proporcionou maior amplificação do sinal e um maior deslocamento do potencial de pico para ambas as fluoroquinolonas.

Figura 16 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactantes catiônicos: (a) DSS, (b) BCTA, (c) LSS, para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR sobre superfície de ECI em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$.



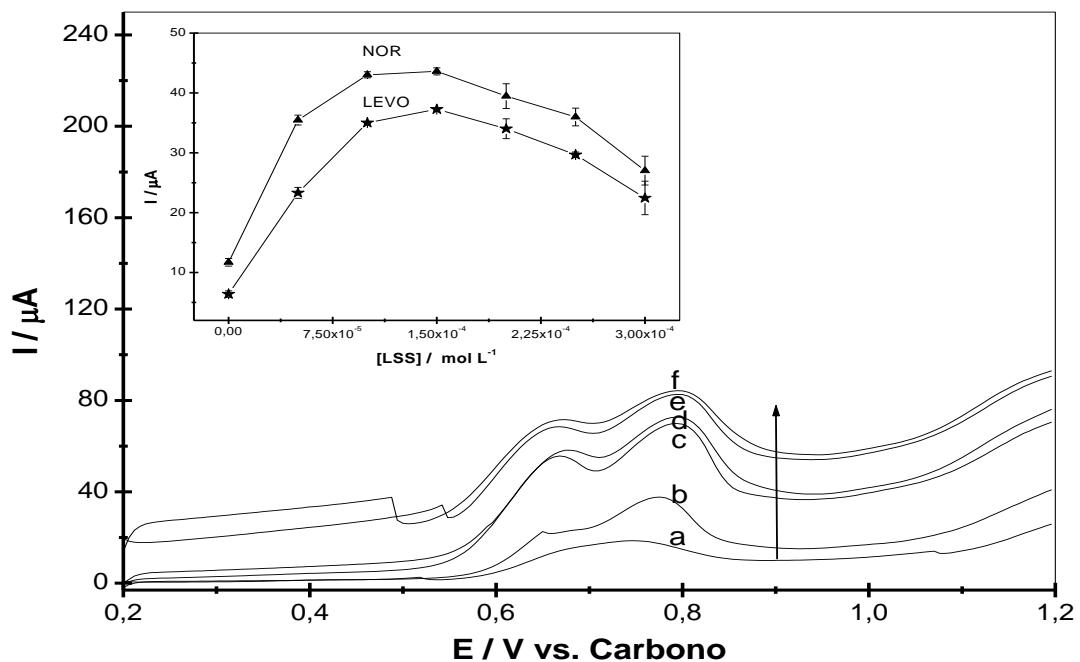
Fonte: próprio autor

Na sequência avaliou-se a influência da concentração do surfactante LSS no intervalo de $5,00 \times 10^{-5}$ a $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a intensidade da corrente de pico e no perfil voltamétrico. De acordo com a Figura 17, verifica-se, para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, que a corrente de pico aumenta com o aumento da concentração do surfactante LSS até atingir um máximo em um valor de

concentração entre $1,00 \times 10^{-4}$ e $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Este comportamento indica que neste intervalo de concentração o surfactante encontra-se como monômero, e as interações são predominantemente eletrostáticas [69]. Para concentrações superiores a $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, a intensidade da corrente de pico decai significativamente, seguida de uma má resolução dos picos para ambas as fluoroquinolonas. Este comportamento pode ser indicativo de que, a partir deste valor de concentração, há formação de agregados micelares entre surfactante/analito e, desta forma, dificulta o processo de transferência eletrônica devido ao aumento da concentração micelar crítica, que, conseqüentemente, influencia no coeficiente de difusão da espécie no meio.

Com base nesses resultados experimentais, a concentração do surfactante LSS escolhida foi de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, a qual foi considerada como condição ideal para os propósitos iniciais deste trabalho. Nesta condição, foi possível obter uma considerável amplificação da intensidade do sinal e uma melhora na resolução voltamétrica entre os picos de oxidação das fluoroquinolonas em estudo.

Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença de surfactante LSS para a oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de NOR e $5,85 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de LEVO sobre superfície de ECI em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0. (a) ausência de LSS, (b) na presença de $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de LSS, (c) na presença de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LSS, (d) na presença de $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LSS, (e) na presença de $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LSS e (f) na presença de $2,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de LSS. $f = 20$ Hz, $E_{sw} = 30$ mV e $E_s = 6$ mV.



Fonte: próprio autor

4.2.4 Influência do pH e da solução do eletrólito de suporte

Como foi verificado nos resultados obtidos com o desenvolvimento da Metodologia I, as soluções do eletrólito suporte com diferentes tipos de sais e composição podem fornecer condições apropriadas não só no que se refere a janela de potencial como também melhora na separação dos picos proveniente do deslocamento de potencial. Diante disso, os mesmos podem afetar diferentemente as condições da reação eletrodica, ora por melhorar a solubilidade do analito no meio ora por modificar o mecanismo da interação (presença de surfactante) do mesmo na superfície do eletrodo e, por consequência, a resposta voltamétrica. Sendo assim, nessa etapa o objetivo foi otimizar e encontrar o melhor pH do eletrólito suporte visando obter um sinal eletroanalítico relevante para a oxidação das fluoroquinolonas em questão.

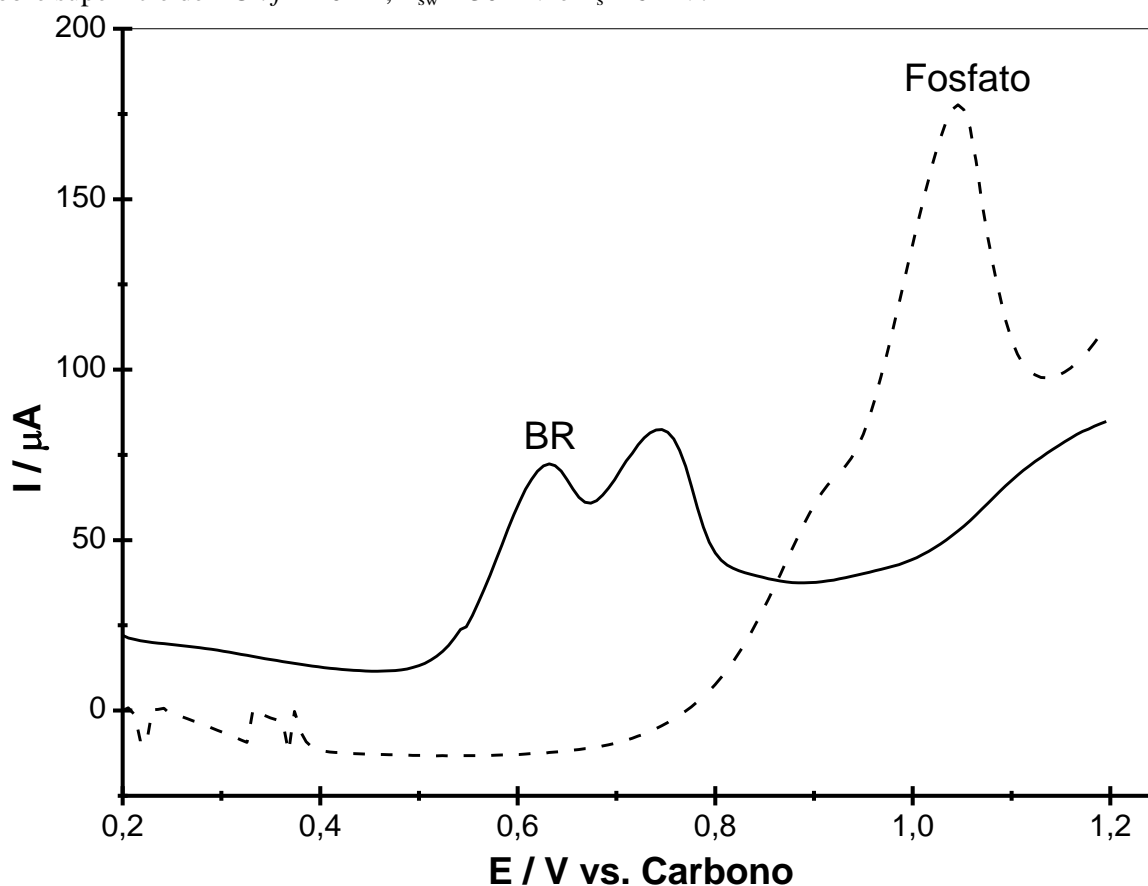
Para a escolha do melhor eletrólito suporte, diferentes tampões com diferentes composições foram avaliados. Inicialmente, optou-se pelo tampão fosfato e o tampão Britton-Robinson, ambos na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. A Figura 18 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos registrados para o estudo do comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas utilizando estes dois tampões como eletrólito. Novamente, observa-se que não houve distinção dos picos de oxidação para ambas as fluoroquinolonas analisadas simultaneamente em tampão fosfato. Neste caso, apenas um pico é observado devido à sobreposição dos mesmos e a falta de resolução voltamétrica. Além disso, há um deslocamento dos picos para potenciais mais positivos quando o tampão fosfato é utilizado como eletrólito, cujo meio demanda uma maior energia para a ocorrência do processo de oxidação das fluoroquinolonas.

No estudo empregando o tampão BR, é possível observar (Figura 18) um deslocamento satisfatório dos potenciais de oxidação de ambas as fluoroquinolonas para valores menos positivos, sendo possível detectar nitidamente a ocorrência de dois picos que ocorrem com uma diferença de potencial de, aproximadamente, $0,12 \text{ V}$. Assim, para escolha do melhor eletrólito suporte foi considerado como características, correntes faradaicas estáveis e de maior intensidade bem como melhora na separação dos picos proveniente do deslocamento de potencial para região de menor energia.

No estudo seguinte verificou-se a possibilidade de utilização de solvente orgânico metanol na proporção de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% para modificar a composição do eletrólito de suporte, tampão aquoso, tal como otimizado no desenvolvimento da Metodologia I. A

escolha deste parâmetro foi um compromisso entre intensidade da corrente de pico, resolução voltamétrica e a reprodutibilidade. Considerando estes aspectos, o solvente orgânico que proporcionou melhor resposta voltamétrica foi o metanol na proporção de 0,50%, sendo esta adotada para estudos posteriores realizados sobre a superfície do ECI.

Figura 18 - Influência do eletrólito de suporte na intensidade da corrente de pico em VOQ para uma solução de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Na presença de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS sobre superfície de ECI. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$.



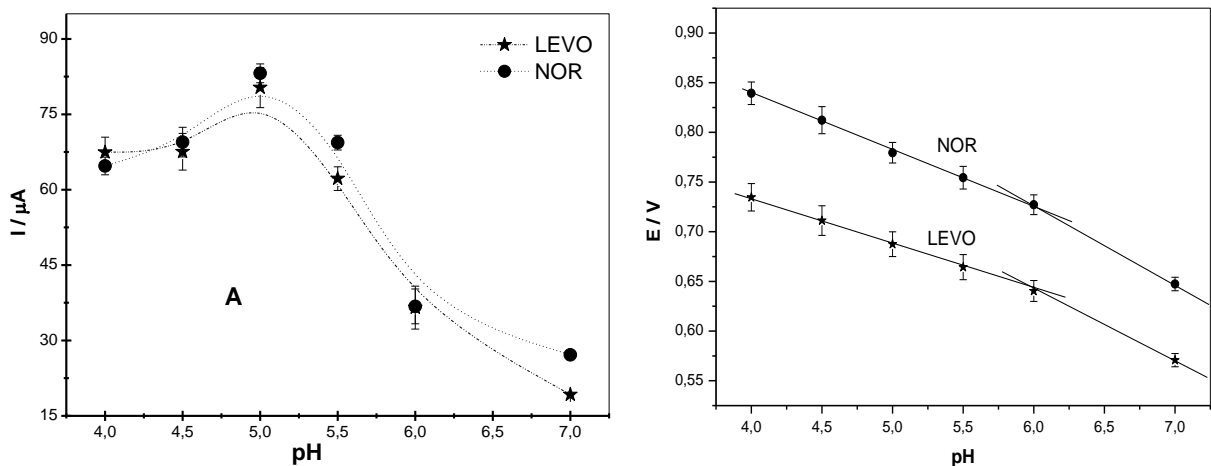
Fonte: próprio autor

A influência do pH sobre o comportamento voltamétrico da LEVO e NOR foi investigada sobre a superfície do ECI. A relação entre corrente de pico vs. pH e potencial de pico vs. pH obtida para oxidação eletroquímica de $5,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dessas fluoroquinolonas em meio de tampão BR $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,50% de metanol e presença de $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS é mostrado na Figura 19. Como verificado na Figura 19 A, um máximo na intensidade da corrente de pico é obtido em uma valor de pH ao redor de 5,0, e a partir desse valor observa-se uma queda pronunciada até pH 7,0. Um

deslocamento do potencial de pico para valores mais negativo é observado com o aumento do pH, cujo comportamento revela o envolvimento de reações de protonação. A presença de surfactante no meio, neste caso, não altera significativamente no equilíbrio de protonação.

Assim, a melhor condição para monitorar a oxidação simultânea das fluoroquinolonas, LEVO e NOR, sobre a superfície do ECI foi semelhante àquela otimizada utilizando o ECV, sendo esta: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) contendo 0,5% de metanol e esta condição foi escolhida para propósitos analíticos.

Figura 19 - Influência do pH na resposta da corrente de pico (A) e do potencial de pico (B) para oxidação eletroquímica de $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO e $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR sobre a superfície de ECI em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0 – 7,0) contendo 0,5% de metanol. $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 6 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor

4.2.5 Procedimento de deconvolução dos picos voltamétricos

De acordo com os resultados preliminares, verifica-se que, embora estas fluoroquinolonas possam ser facilmente detectadas individualmente, o mesmo não se aplica à mistura de ambas, devido a uma sobreposição dos picos voltamétricos. A otimização dos parâmetros experimentais, tais como, eletrólito suporte, pH, surfactante e a utilização do ECI, não foi suficiente para promover a separação completa dos picos de oxidação de ambas as fluoroquinolonas. Assim, tal como foi utilizado no desenvolvimento da Metodologia I, uma ferramenta para auxiliar na separação dos picos dessas fluoroquinolonas foi a aplicação do tratamento matemático de deconvolução. Para tal, utilizou-se a ferramenta de análise gaussiana mediante o uso do software Origin 6.0 e, tal como verificado anteriormente na Metodologia I, não foi observada nenhuma interferência significativa nos valores dos

parâmetros obtidos pela deconvolução dos picos tanto da LEVO quanto da NOR. Sendo assim, o procedimento de deconvolução foi adotado como alternativa satisfatória para separação dos picos voltamétricos de ambas as fluorquinolonas bem como aplicado com sucesso na quantificação destes picos.

4.2.6 Otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais

As condições experimentais e os parâmetros instrumentais que influenciam na resposta voltamétrica obtidos pela técnica de VOQ, os quais destacam a frequência de aplicação e pulso de potencial, incremento de varredura de potencial e a amplitude de aplicação de pulsos de potencial foram avaliados e são apresentados na Tabela 7. Assim como anteriormente citado, a escolha da melhor condição de trabalho foi um compromisso entre intensidade do sinal e a resolução voltamétrica, obtidos dos picos de oxidação de cada fluoroquinolona após o procedimento de deconvolução.

Tabela 7 - Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para o desenvolvimento do método eletroanalítica usando voltametria de onda quadrada e eletrodo de trabalho de carbono impresso.

Parâmetros	Tipo ou intervalo testado	Otimizados
Eletrólito de suporte	Fosfato, Britton–Robinson (BR) e etanol ou metanol	Britton–Robinson e 0,50% metanol
Surfactantes	LSS, DSS e BCTA	LSS
Concentração do surfactante	$5,00 \times 10^{-5} - 2,50 \times 10^{-4}$ (mol L ⁻¹)	$1,00 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹
pH (tampão BR)	4,0 – 7,0	5,0
Frequência (<i>f</i>)	10 - 35 Hz	15 Hz
Incremento de potencial (ΔE_s)	2,0 - 10 mV	4,0 mV
Amplitude (E_{sw})	10 - 60 mV	30 mV
Tempo de equilíbrio	5 - 15 s	7,5 s

4.2.7 Curva analítica

Após otimizar as melhores condições de trabalho, estudos foram realizados monitorando a oxidação eletroquímica da LEVO e da NOR em diferentes concentrações. A partir dos valores de corrente de pico foi construída uma curva de calibração, em que cada ponto representa à média de três medidas experimentais. Uma relação linear foi obtida somente no intervalo de concentração entre $0,25 \times 10^{-6}$ e $30,10 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, cujos valores dos parâmetros obtidos para estas curvas estão reunidos na Tabela 8. A partir dos parâmetros obtidos para esta curva foram calculados os limites de detecção para cada analito.

Os valores obtidos para o LOD foram: $3,22 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para a LEVO e $8,32 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para NOR (Tabela 8), indicando detectabilidade satisfatória e que o sistema eletroquímico composto pelos ECIs viabiliza a utilização da metodologia proposta para a quantificação simultânea dessas fluoroquinolonas.

Tabela 8 – Algumas figuras de mérito do método eletroanalítico para determinação simultânea de LEVO e NOR utilizando ECI nas condições otimizadas.

Parâmetros	LEVO	NOR
Faixa Linear (mol L ⁻¹)	$(0,25-30,1) \times 10^{-6}$	$(0,25-30,1) \times 10^{-6}$
Inclinação (μ A)	$-1,04 \times 10^{-1}$	$-2,47 \times 10^{-1}$
DP da Inclinação	$8,52 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-2}$
Intercepto (μ A L μ mol ⁻¹)	$7,95 \times 10^5$	$8,03 \times 10^5$
DP do intercepto	$7,43 \times 10^3$	$1,56 \times 10^4$
Coefficiente de correlação	0,9998	0,9991
LOD (mol L ⁻¹)	$3,22 \times 10^{-8}$	$8,32 \times 10^{-7}$
LOQ (mol L ⁻¹)	$1,07 \times 10^{-7}$	$2,77 \times 10^{-6}$

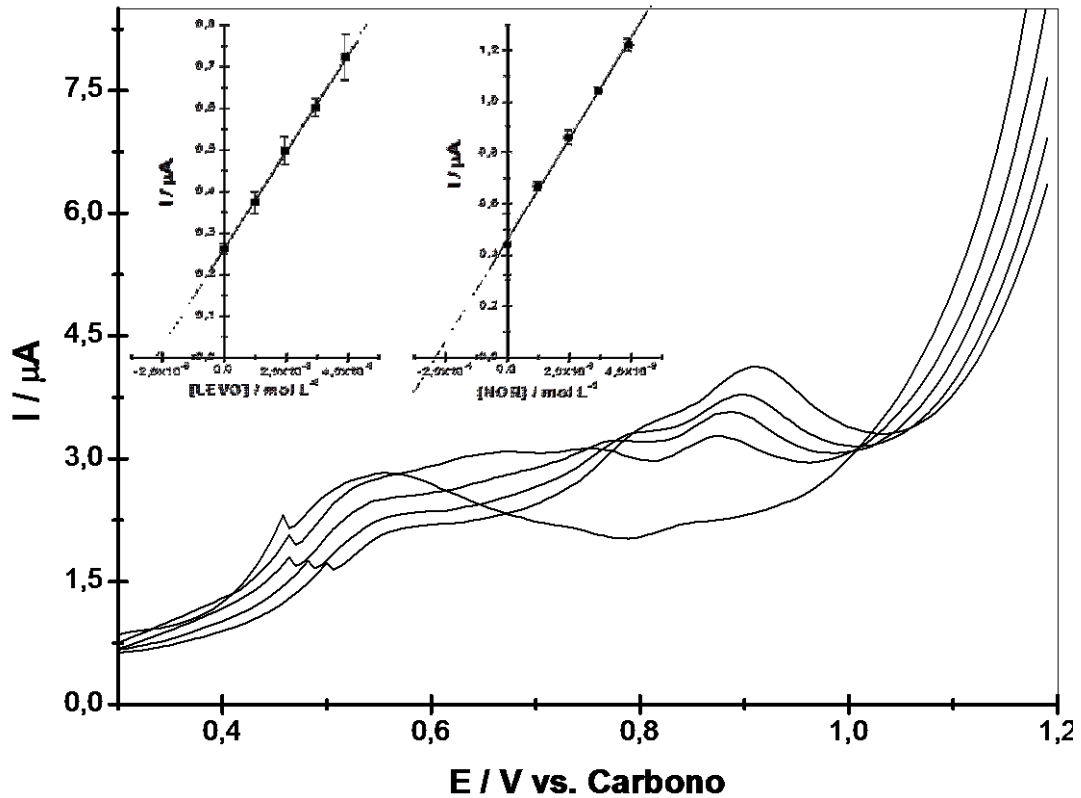
DP = desvio padrão.

4.2.8 Aplicação da metodologia desenvolvida

4.2.8.1 Determinação de LEVO e NOR em amostras biológicas

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação simultânea das fluoroquinolonas LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina seguindo a metodologia descrita na parte experimental 3.3.3. A Figura 20 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtido para a determinação simultânea de LEVO e NOR em uma mistura, após o enriquecimento de uma amostra de urina bovina com 50 mg L^{-1} de cada fluoroquinolona, e após aplicação do procedimento de deconvolução. Como pode ser observado, é notória a ausência do efeito de matriz, uma vez que o perfil voltamétrico de ambas as fluoroquinolonas não é afetado pelas espécies interferentes provenientes da amostra biológica, exibindo dois picos de oxidação bem definidos. Além disso, após a aplicação do procedimento de deconvolução, verificou-se a separação satisfatória desses picos, os quais foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração na célula, cujas curvas de adição de padrão foram lineares e com coeficiente de correlação sempre maior do que 0,999 (Figura 20, inserção), indicando que as determinações analíticas podem ser executadas com elevada confiabilidade.

Figura 20 - Voltamograma de onda quadrada obtido para a oxidação eletroquímica simultânea de LEVO e NOR sobre superfície do ECI em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de metanol (pH 5,0) na presença de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante LSS na presença de amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR. $f = 15 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $E_s = 4 \text{ mV}$. E curva de adição de padrão (inserção) para amostra de urina bovina contendo 50 mg L^{-1} de LEVO e NOR e sucessivas adições de $9,90 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ das fluoroquinolonas.



Fonte: próprio autor

Os estudos de recuperação das fluoroquinolonas variaram entre 96,8% a 101,1% para LEVO e 98,0% a 100,8% para NOR, demonstrando que a metodologia eletroanalítica proposta, pode ser usada com sucesso para a quantificação simultânea desses analitos em amostras de urina humana e bovina, tendo em vista que não foram observados efeitos de matriz em nenhuma dessas amostras. Além disso, não foi necessário o uso de etapas rigorosas de pré-tratamento dessas amostras mesmo para aquelas contendo baixos níveis de concentração desses analitos.

Tabela 9 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão dos métodos proposto obtido para amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações de LEVO e NOR.

Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^[a] (mg L ⁻¹)	Recuperado (%)	DPR (%)
LEVO				
Urina humana	200	200 ± 5	100,2	0,9
	100	99 ± 1	99,2	0,6
	50	48 ± 2	96,8	2,0
Urina bovina	200	199 ± 10	99,5	2,0
	100	101 ± 5	101,1	2,2
	50	50 ± 3	100,2	2,3
NOR				
Urina humana	200	199 ± 1	99,7	0,2
	100	98 ± 6	98,4	2,6
	50	49 ± 3	98,0	2,3
Urina bovina	200	198 ± 8	99,2	1,7
	100	101 ± 6	100,8	2,6
	50	49 ± 9	98,0	7,6

^[a] Média de três determinações ± intervalo de confiança (N = 3), t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade), DPR: desvio padrão relativo.

4.2.8.2 Determinação de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas

O método proposto também foi aplicado para a determinação de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas, obtendo resultados satisfatórios. Amostras de formulações farmacêuticas contendo as fluoroquinolonas de interesse foram analisadas usando o método de adição de padrão e os resultados foram comparados com os valores rotulados desses produtos, cujos resultados encontrados são apresentados na Tabela 10. As curvas de adição de padrão foram lineares, com coeficientes de correlação sempre próximos de 0,999. Como esperado os excipientes das formulações farmacêuticas não interferiram nas análises de quantificação, sendo os efeitos de matriz ausentes nessas amostras.

Como pode ser observado na Tabela 10, os resultados obtidos revelam precisão satisfatória para determinação de ambas as fluoroquinolonas pelo método proposto, uma vez

que os valores encontrados nessas análises foram próximos aos valores rotulado, demonstrando que o método é uma alternativa aceitável para determinação eletroanalítica de LEVO e NOR em formulações de produtos farmacêuticos que contenham essas fluoroquinolonas.

Tabela 10 - Determinação quantitativa de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.

Amostra	Valor rotulado (mg)	Encontrado (mg) ^[a]	DPR (%)	Erro relativo (%)
Levofloxacina	500	501 ± 10	0,8	0,002
Norfloxacina	400	398 ± 7	0,7	0,005

^[a] Os resultados apresentados em forma de intervalo médio valor de confiança (N = 3) , t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade) .

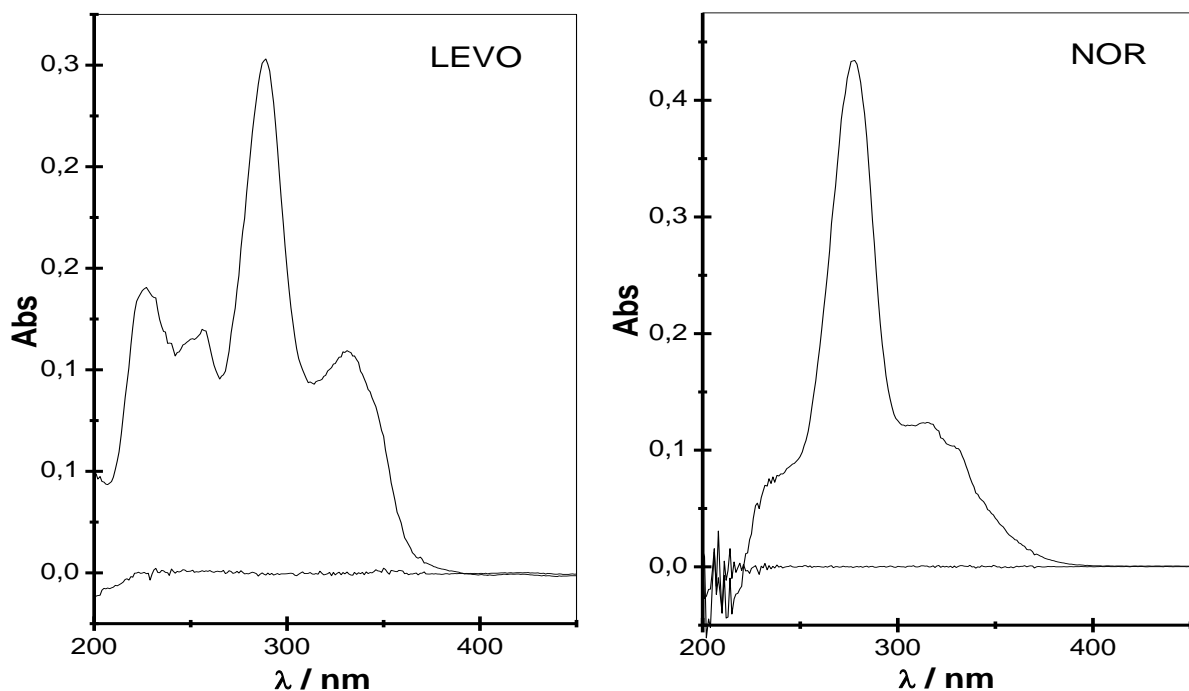
4.3 Desenvolvimento de metodologia III – Estudos espectrofotométricos na região do UV/Vis

Com finalidade de obter resultados comparativos que permitam testar a viabilidade de utilização da metodologia eletroanalítica proposta neste trabalho, foi desenvolvido um método para determinação individual das fluoroquinolonas LEVO e NOR empregando a técnica espectrofotométrica na região do UV/Vis. Experimentos monitorando a detecção no UV/Vis para uma solução de $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ da fluoroquinolona LEVO em 30% de metanol mostrou que este exibe um máximo de absorção em 290,03 nm. Ao mesmo tempo, para uma solução da fluoroquinolona NOR em 5% de ácido acético, um máximo de absorção foi obtido em 277,94 nm. A Figura 21 exibe os espectros de absorção obtidos para as fluoroquinolonas LEVO e NOR nas condições supracitadas.

A partir do valor de absorbância obtido para a LEVO de 290,03 nm, foi construída a curva de calibração analítica, que apresentou linearidade na faixa de $1,00 \times 10^{-4}$ a $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com equação de regressão de $Abs = 0,03 + 3,17 \times 10^4 C_{LEVO}$ (mol L⁻¹), r= 0,9974. No comprimento de onda de 277,94 foi construída uma curva de calibração para a fluoroquinolona NOR, que apresentou linearidade na faixa de $1,00 \times 10^{-4}$ a $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com equação de regressão de $Abs = 0,03 + 4,41 \times 10^4 C_{NOR}$ (mol L⁻¹) e coeficiente de correlação igual a 0,9992.

A partir dos dados obtidos para as curvas de calibração das fluoroquinolonas LEVO e NOR calculou-se o limite de detecção (LOD) usando a relação matemática: $(3 \times DP/b)$. Em que, **DP** representa o desvio padrão da média aritmética de dez medidas do branco obtidas no comprimento de onda de 290,03 nm para LEVO e 277,94 nm para NOR e **b**, a inclinação da curva de calibração. O LOD encontrado para a LEVO foi de $2,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e para a NOR foi de $1,23 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os limites de quantificação (LOQ) também foram calculados usando a relação matemática: $(10 \times DP/b)$. Em que, **DP** representa o desvio padrão da média aritmética de dez medidas do branco obtidas no comprimento de onda de 290,03 nm para LEVO e 277,94 nm para NOR e **b**, a inclinação da curva de calibração. O LOQ encontrado para a LEVO foi de $7,50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e para a NOR foi de $4,12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores indicam que a técnica possui detectabilidade satisfatória para os propósitos deste trabalho, de modo que foi empregada para a determinação individual dessas fluoroquinolonas em amostras de urina humana e bovina e em formulações farmacêuticas.

Figura 21 - Espectro de absorção de UV-Vis para $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LEVO em 30 % de metanol e $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ NOR em 5% de ácido acético.



Fonte: próprio autor

Após a obtenção das curvas de calibração para os padrões de LEVO e NOR, o método foi aplicado para a determinação das mesmas em amostras de urina humana e bovina e

também em formulações farmacêuticas. Além disso, foram realizados testes de recuperação para todas as amostras através do método de adição de padrão. Assim sendo, as determinações de LEVO e NOR foram realizadas através da diluição de alíquotas da amostra para 25 mL com 30% de metanol para LEVO e 5% de ácido acético para NOR. Os resultados obtidos para os testes de adição do padrão das fluoroquinolonas encontram-se reunidos na Tabela 11 e 12.

Na determinação individual de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina (Tabela 11) a recuperação obtida foi entre 101,1 e 109,6% para LEVO e 102,6 e 110,8% para NOR, sendo que em amostras de urina humana e bovina contendo 50 mg L⁻¹ das fluoroquinolonas não foram detectadas. Nas determinações de formulações farmacêuticas pela metodologia eletroanalítica proposta neste trabalho, observa-se que a técnica espectrofotométrica é menos sensível (Tabela 12), como confirmado nos valores de LOD e LOQ apresentados.

Tabela 11 - Resultados das curvas de recuperação, exatidão e precisão do método UV-Vis obtido para detecção individual de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina fortificada com diferentes concentrações.

Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^[a] (mg L ⁻¹)	Recuperado (%)	DPR (%)
LEVO				
Urina humana	200	219 ± 47	109,6	8,6
	100	106 ± 19	106,4	7,1
	50	nd	nd	Nd
Urina bovina	200	208 ± 20	103,8	3,9
	100	101 ± 25	101,1	10,1
	50	nd	nd	Nd
NOR				
Urina humana	200	222 ± 34	110,8	6,1
	100	106 ± 49	105,6	18,7
	50	nd	nd	Nd
Urina bovina	200	209 ± 33	104,5	6,4
	100	103 ± 21	102,6	8,3
	50	nd	nd	Nd

^[a] Média de três determinações ± intervalo de confiança (N = 3), t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade), RSD: desvio padrão relativo; nd: não detectado.

Tabela 12 - Determinação quantitativa individual de LEVO e NOR em formulações farmacêuticas utilizando ambas as metodologias propostas.

Amostra	Valor rotulado (mg)	Encontrado (mg) ^[a]	DPR (%)	Erro relativo (%)
Levofloxacina	500	506 ± 10	18,8	0,01
Norfloxacina	400	402 ± 7	9,31	0,01

^[a] Os resultados apresentados em forma de intervalo médio valor de confiança (N = 3) , t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade)

5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a possibilidade de determinação simultânea das fluoroquinolonas, levofloxacina (LEVO) e norfloxacina (NOR) empregando a técnica de voltametria de onda quadrada, surfactantes e aplicação do procedimento de deconvolução. A utilização do eletrodo de carbono vítreo foi essencial para a escolha das melhores condições de trabalho e obtenção de um conhecimento prévio do comportamento voltamétrico dessas fluoroquinolonas, para posterior utilização dos eletrodos de carbono impresso. Porém a proximidade dos potenciais de oxidação das duas fluorquinolonas durante as análises simultâneas inviabilizaram a determinação direta, entretanto, este problema foi contornado com a utilização de surfactante, que auxiliou na amplificação do sinal analítico, e o procedimento de deconvolução de picos, que proporcionou a separação satisfatória dos sinais sem comprometer a análise quantitativa dos respectivos picos. Os eletrodos de carbono impressos apresentaram uma grande vantagem se considerarmos os aspectos de sensibilidade, faixa de linearidade, precisão e ainda limite de quantificação, compatível com o nível de concentração da fluoroquinolonas encontrados nessas matrizes. Assim as metodologias desenvolvidas para as determinações individuais e simultâneas das fluoroquinolonas em amostras de urina humana, urina bovina e formulações farmacêuticas, podem ser uma alternativa altamente satisfatória na determinação das mesmas. Estas justificativas são amparadas pela maior sensibilidade e melhores valores de recuperação obtidos pelo método proposto que aqueles obtidos nas análises empregando a metodologia de UV-Vis. Além disso, verificou-se que as amostras de urina humana e bovina, apesar dos diversos constituintes, não interferiram nas análises eletroquímicas, confirmando que as metodologias desenvolvidas podem ser aplicadas com sucesso na determinação destes antibióticos sem preparos rigorosos dessas amostras.

Por fim, os resultados analíticos obtidos com os métodos desenvolvidos são comparados entre si bem como entre as análises individuais e simultâneas dessas fluoroquinolonas tanto em ECV quanto em ECI. A Tabela 13 e 14 apresentam de forma resumida as principais características dos métodos desenvolvidos.

Tabela 13 - Análise comparativa dos diferentes métodos e sistema de detecção empregados para a determinação das fluorquinolonas em urina.

Técnicas	Deteção	Analito	Região linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^[a] (mg L ⁻¹)
VOQ	Simultânea ECI	LEVO	$(0,25 - 30,1) \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^{-8}$	Urina Humana	50	48 ± 2
						100	99 ± 1
						200	200 ± 5
					Urina Bovina	50	50 ± 3
						100	101 ± 5
						200	199 ± 10
	NOR	$(0,25 - 30,1) \times 10^{-6}$	$8,32 \times 10^{-7}$	Urina Humana	50	49 ± 3	
					100	98 ± 6	
					200	199 ± 1	
				Urina Bovina	50	49 ± 9	
					100	101 ± 6	
					200	198 ± 8	
VOQ	Simultânea ECV	LEVO	$(2,00 - 20,0) \times 10^{-6}$	$2,97 \times 10^{-7}$	Urina Humana	50	49 ± 9
						100	94 ± 28
						200	180 ± 22
					Urina Bovina	50	51 ± 4
						100	101 ± 12
						200	187 ± 17
	NOR	$(2,00 - 20,0) \times 10^{-6}$	$7,90 \times 10^{-7}$	Urina Humana	50	47 ± 12	
					100	88 ± 18	
					200	200 ± 38	
				Urina Bovina	50	54 ± 12	
					100	95 ± 15	
					200	185 ± 35	

Continuação Tabela 13

Determinação eletroanalítica simultânea das fluoroquinolonas, levofloxacin e norfloxacin, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução

Conclusão

Método	Deteção	Analito	Região linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^[a] (mg L ⁻¹)
VOQ	Individual ECV	LEVO	$(2,00 - 23,3) \times 10^{-6}$	$1,11 \times 10^{-6}$	Urina Humana	50	51 ± 10
						100	93 ± 8
						200	188 ± 22
					Urina Bovina	50	49 ± 3
						100	97 ± 6
						200	194 ± 35
	NOR	$(2,00 - 23,3) \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-6}$	Urina Humana	50	41 ± 3	
					100	98 ± 10	
					200	201 ± 11	
				Urina Bovina	50	48 ± 5	
					100	97 ± 12	
					200	199 ± 4	
UV	Individual UV-Vis	LEVO	$(0,10 - 100) \times 10^{-6}$	$2,25 \times 10^{-6}$	Urina Humana	50	Nd
						100	106 ± 19
						200	219 ± 47
					Urina Bovina	50	Nd
						100	101 ± 25
						200	208 ± 20
	NOR	$(0,10 - 100) \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-6}$	Urina Humana	50	Nd	
					100	106 ± 49	
					200	222 ± 34	
				Urina Bovina	50	Nd	
					100	103 ± 21	
					200	209 ± 33	

^[a] Média de três determinações ± intervalo de confiança (N = 3), t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade), RSD: desvio padrão relativo; nd: não encontrado

Conclusão

Tabela 14 - Análise comparativa dos diferentes métodos e sistema de detecção empregados para a determinação das fluorquinolonas em formulações farmacêuticas.

Método	Deteção	Analito	Região linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Rotulado (mg)	Encontrado ^[a] (mg)	RSD (%)	Erro relativo (%)
VOQ	Simultâneo	LEVO	$(0,25 - 30,1) \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^{-8}$	500	501 ± 10	0,8	0,002
	ECI	NOR	$(0,25 - 30,1) \times 10^{-6}$	$8,32 \times 10^{-7}$	400	399 ± 7	0,7	0,005
VOQ	Simultâneo	LEVO	$(2,00 - 20,0) \times 10^{-6}$	$2,97 \times 10^{-7}$	500	500 ± 39	3,2	0,072
	ECV	NOR	$(2,00 - 20,0) \times 10^{-6}$	$7,90 \times 10^{-7}$	400	401 ± 38	3,8	0,274
VOQ	Individual	LEVO	$(2,00 - 23,3) \times 10^{-6}$	$1,11 \times 10^{-6}$	500	501 ± 59	4,7	0,003
	ECV	NOR	$(2,00 - 23,3) \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-6}$	400	389 ± 19	1,9	0,029
UV	Individual	LEVO	$(0,1 - 100) \times 10^{-6}$	$2,25 \times 10^{-6}$	500	506 ± 10	18,8	0,012
	UV-Vis	NOR	$(0,1 - 100) \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-6}$	400	402 ± 7	9,3	0,005

^[a] Os resultados apresentados em forma de intervalo médio valor de confiança (N = 3) , t = 4,30 (P = 0,05 com 2 graus de liberdade); RSD: desvio padrão relativo.

6 REFERÊNCIAS

- [1]. HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **Revista Brasileira Medicina**, v. 57, p. 1109-1140, 2000.
- [2]. BUSH, K.; MACIELAG, M. New approaches in the treatment of bacterial infections. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 433-439, 2000.
- [3]. DIETZ, B. L. The fluoroquinolones. **Clinical Toxicology Review**, v. 20, p. 155-158, 1997.
- [4]. HOOPER, D.C. Expanding uses of fluoroquinolones: opportunities and challenges. **Annals of Internal Medicine**, v. 129, p. 908-910, 1998.
- [5]. TILLOTSON, G.S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 320-324, 1996.
- [6]. LESCHER, G.Y. et al. 1-8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutics agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, p. 1063-1068, 1962.
- [7]. APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 5-15, 2000.
- [8]. BRYSKIER, A. CHANTOT, J.F. Classification and structure-activity relationship of fluoroquinolones. **Drugs**, v. 49, p. 16-28, 1995.
- [9]. HOOPER, D.C. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 243-254, 2000.
- [10]. NABER, K.G. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 331-341, 2001.
- [11]. ZHANEL, G.G. et al. The nw fluoroquinolones: a critical review. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 10, p. 207-238, 1999.
- [12]. TAKEMURA, M.; HAYAKAWA, I. Recent advances in the field of quinolones. **II Farmaco**, v. 56, p. 37-40, 2001.
- [13]. SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 363-369, 2010.
- [14]. BELAL, F. et al. Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. **Talanta**, v. 50, p. 765-786, 1999.
- [15]. Bula comprimido 500 mg de Levofloxacin, laboratório Eurofarma.

-
- [16]. Bula comprimido 400 mg de Norfloxacino, laboratório Multilab.
- [17]. LIPSKY, B.A.; BAKER, C.A. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 352-364, 1999.
- [18]. BARTLETT, J.G. et al. Community-Acquired Pneumonia in Adults: Guidelines for Management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 811-838, 1998.
- [19]. OWENS Jr., R.C.; AMBROSE, P.G. Antimicrobial Safety: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. S144-S157, 2005.
- [20]. BERTINO Jr., P.D-J; FISH, P.D-D. The Safety Profile of the Fluoroquinolones. **Clinical Therapeutics**, v. 22, p. 798-817, 2000.
- [21]. COHEN, J.S. Peripheral Neuropathy Associated With Fluoroquinolones. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 35, p. 1540-1547, 2001.
- [22]. CARROLL, D.N.; CARROLL, D.G. Interactions between warfarin and three commonly prescribed fluoroquinolones. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, p. 680-685, 2008.
- [23]. BALL, P.; MANDELL, L.; NIKI, Y.; TILLOTSON, G. Comparative tolerability of the newer fluoroquinolone antibacterials **Drug Safety**, v. 21, p. 407-21, 1999.
- [24]. BALL, P.; ED, F. R. C. P. Efficacy and safety of levofloxacin in the context of other contemporary fluoroquinolones: a review, **Current Therapeutic Research**, v. 64, p. 646-661, 2003.
- [25]. REIG, M.; TOLDRÁ, F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**, v. 78, p. 60-67, 2008.
- [26]. PEREIRA, L. A.; et al. Occurrence, behavior and environmental impacts caused by the presence of veterinary antimicrobials in soils. **Química Nova**, v. 35, p. 159-169, 2012.
- [27]. GONZÁLEZ-HEINZ, G.; et al. Molecular analysis of fluoroquinolones and macrolides resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from humans, bovine and chicken meat. **Revista Chilena Infectología**, v. 30 p. 135-139, 2013.
- [28]. CERNIGLIA, C. E.; KOTARSKI, S. Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 29, p. 238-261, 1999.
- [29]. DOWLING, G. **Analytical strategies for drug residues in various matrices in a regulatory laboratory**. Dublin 2012, School of Chemical and Pharmaceutical Sciences, Dublin Institute of Technology, Kevin Street, Dublin 8 - 2012. Thesis of Doctor, 231 p.
- [30]. SANTOS, A. L.; et al. Electrochemical, spectrophotometric and liquid-chromatographic approaches for analysis of tropical disease drugs. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 69-88, 2009.
- [31]. MOREIRA, G. F.; et al. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para

- Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, p. 22-29, 2010.
- [32]. **The United States Pharmacopeia XXI e NF 16**, US Pharmacopeial Convention, MD, p.219, 220, 705, 706, 1985.
- [33]. **The British Pharmacopoeia**, vol I e II, Her Majesty's Stationery Office, London, p.382, 741, 971, 1988.
- [34]. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1,2.
- [35]. EL-MAALI, N.A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 99-107, 2004.
- [36]. GONZÁLES, J. A. O.; et al. Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum. **Talanta**, v. 52, p. 1149–1156, 2000.
- [37]. STANKOVA, M.; et al. Fluorometric and derivative spectrophotometric determination of norfloxacin. **Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication**, v. 26, p. 1709-1714, 1993.
- [38]. AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E.; EL-DOSOKY, R.M.S. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in dosage forms and biological fluids using ion-pair complex formation. **Analytical Letters**, v. 41, p. 837-852, 2008.
- [39]. ERK, N. Voltammetric behaviour and determination of moxifloxacin in pharmaceutical products and human plasma. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1351-1356, 2004.
- [40]. WONG, F. A.; JUZWIN, S. J.; FLOR, S. C. Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 765–771, 1997.
- [41]. SOUSA, J.; et al. First liquid chromatography method for the simultaneous determination of levofloxacin, pazufloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 930, p. 104-111, 2013.
- [42]. SAMANIDOU, V. F.; et al. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 623-629, 2003.
- [43]. BOPPANA, V. K.; SWANSON, B. N. Determination of norfloxacin, a new nalidixic acid analog, in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 808-810, 1982.
- [44]. BELTAGI A.M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 1079-1088, 2003.
- [45]. GHONEIM, M. M.; TAWFIK, A. Assay of anti-coagulant drug warfarin sodium in

- pharmaceutical formulation and human biological fluids by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 63-69, 2004.
- [46]. GHONEIM, M.M. et al. Determination of norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on glass carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 205-210, 2001.
- [47]. IBRAHIM, M.S.; SHEHATTA, I.S.; SULTAN, M.R. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of nalidixic acid in pharmaceuticals, human urine and serum. **Talanta**, v. 56, p. 471-479, 2002.
- [48]. NAVALÓN, A. et al. Determination of the antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetric. **Analytica chimica acta**, v. 454, p. 83-91, 2002.
- [49]. RADI, A.; EL-SHERIF, Z. Determination of levofloxacin in human urine by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 58, p. 319-324, 2002.
- [50]. TAMER, A. Adsorptive stripping voltammetric determination of ofloxacin. **Analytica Chimica Acta**, v. 231, p. 129-131, 1990.
- [51]. VÍLCHEZ, J.L. et al. Determination of the antibacterial trovafloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetric. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 465-471, 2003.
- [52]. VÍLCHEZ, J.L. et al. Differential-pulse adsorptive stripping voltammetric determination of the antibiotic lomefloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 23-29, 2001.
- [53]. OSTERYOUNG, J.; O'Dea, J. J. Square-wave voltammetry; In: Bard, A. J., **Electroanalytical chemistry**; New York: Marcel Dekker, 1986, cap. 14.
- [54]. NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. A.; Eletrodos fabricados por "silk-screen" **Química Nova**, v. 21, p. 614-629, 1998.
- [55]. HART, J.P.; WRING, S.A. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 89-103, 1997.
- [56]. SOUZA, D. et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. **Química Nova**, v. 26, p. 790-797, 2004.
- [57]. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003b.
- [58]. GHONEIM, M. M. et al. Determination of norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on a glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 205-210, 2001.
- [59]. TRINDADE, M. A. G. **Métodos eletroanalíticos e cromatográficos aplicados na**

- análise de corantes usados como marcadores em combustíveis.** Araraquara - SP, Programa de Pós-Graduação em Química - UNESP, 2009. Tese de Doutorado, 195 p.
- [60]. TRINDADE, M. A. G.; ZANONI, M. V. B. Voltammetric sensing of the fuel dye marker Solvent Blue 14 by screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, p. 257-263, 2009.
- [61]. RADI, A. E.; KHAFAGYA, A.; EL-SHOBAKYA, A.; EL-MEZAYEN, H. Anodic voltammetric determination of gemifloxacin using screen-printed carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 132-136, 2013.
- [62]. BERGAMINI, M. F.; ZANONI, M. V. B. Anodic stripping voltammetric determination of autothiomalate in urine using a screen-printed carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 18, p. 1457-1462, 2006.
- [63]. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- [64]. VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, p. 15-34, 2002.
- [65]. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.
- [66]. HOYER, B.; JENSEN, N. Suppression of surfactant interferences in anodic stripping voltammetry by sodium dodecyl sulfate. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 759-764, 2003.
- [67]. HOYER, B.; JENSEN, N. Suppression of protein interferences in anodic stripping voltammetry by sodium dodecyl sulphate. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 257-261, 2003.
- [68]. HOYER, B.; JENSEN, N. Stabilization of the voltammetric serotonin signal by surfactants. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 323-328, 2006.
- [69]. HOYER, B.; JENSEN, N. Stabilization of the voltammetric response of organic analytes with self-passivating electrode reactions: synergistic effect of surfactants and high buffer strength. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, p. 153-160, 2007.
- [70]. JARA-ULLOA, P.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Micellar effects on the reduction of 4-nitroimidazole derivative: detection and quantification of the nitroradical anion. **Electroanalysis**, v. 19, p. 1490-1495, 2007.
- [71]. HU, C.; YANG, C.; HU, S. Hydrophobic adsorption of surfactants on water-soluble carbon nanotubes: a simple approach to improve sensitivity and antifouling capacity of carbon nanotubes-based electrochemical sensors. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 128-134, 2007.
- [72]. AVRANAS, A.; RETTER, U.; MALASIDOU, E. The adsorption and condensed film

- formation of cetyltrimethylammonium bromide at the mercury/electrolyte interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 248, p. 347-354, 2002.
- [73]. BERGAMINI, M. F. et al. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 54-59, 2005.
- [74]. BERGAMINI, M. F.; ZANONI, M. V. B. Anodic stripping voltammetric determination of autothiomalate in urine using a screen-printed carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 18, p. 1457-1462, 2006.
- [75]. BERGAMINI, M. F.; OLIVEIRA, F. C. M.; ZANONI, M. V. B. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. **Eclética Química**, v. 30, p. 53-59, 2005.
- [76]. MASAWAT, P.; SLATER, J. M. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 124, p. 127-132, 2007.
- [77]. HOSSEINZADEHA, R.; SABZID, R. E.; GHASEMLUB, K. Effect of cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) in determination of dopamine and ascorbic acid using carbon paste electrode modified with tin hexacyanoferrate, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 213-217, 2009.
- [78]. CARAMINT, R. P.; et al. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed Electrodes. **Fuel**, v. 105, p. 306-313, 2013.
- [79]. VIVÓ-TRUYOLS, G.; et al. Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals Part II: Peak model and deconvolution algorithms. **Journal of Chromatography A**, v. 1096, p. 146-155, 2005.
- [80]. ELSABEE, M.; PRANKERD, R.J. Solid-state properties of drugs. II. Peak shape analysis and deconvolution of overlapping endotherms in differential scanning calorimetry of chiral mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 86, p. 211-219, 1989.
- [81]. NORLI, H. R.; et al. Independent evaluation of a commercial deconvolution reporting software for gas chromatography mass spectrometry analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2056-2064, 2010.
- [82]. MARBÁN, G.; et al. A simple visible spectrum deconvolution technique to prevent the artefact induced by the hypsochromic shift from masking the concentration of methylene blue in photodegradation experiments. **Applied Catalysis A: General**, v. 402, p. 218-223, 2011.
- [83]. GARBELLINI, G. S.; PEDROSA, V. A.; SALAZAR-BANDA, G. R. Electroanalytical methodologies for the determination of triazine herbicides by square wave voltammetry and deconvolution techniques. **Química Nova**, v. 30, p.2025-2034, 2007.

- [84]. BRETT, A. M. O., BRETT, C. M. A., **Eletroquímica princípios, métodos, e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1993. p.191-245.
- [85]. AGOSTINHO, L. M. S. et al. O eletrólito de suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.
- [86]. CAÇO, A. I. G. B. **Influência do Par Iônico na Partição de Fluoroquinolonas**. Aveiro - Portugal, Departamento de Química - Aveiro, 2008. Tese de Mestrado, 72 p.
- [87]. POPOVIC, G. et al. Study of acid-base equilibrium of fleroxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 859-863, 1998.
- [88]. MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**, Ellis Horwood, West Sussex, 1993.