



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

ESTUDOS ELETROANALÍTICOS DAS FLUOROQUINOLONAS ENROFLOXACINA E CIPROFLOXACINA

*Luiz Henrique de Oliveira¹, Ana Caroline Souza Dias¹, Rosilene Marques Correia¹, Magno Aparecido Gonçalves Trindade²

UFGD/FACET, Caixa Postal 533, CEP: 79.804-970, Dourados – MS, *E-mail l-u-i-zhenrique@hotmail.com

UFMS/Departamento de Química, Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande - MS

¹ Bolsistas de Iniciação Científica do CNPq/UFGD, Acadêmico do Curso de Química, FACET/UFGD

² Orientador, Docente da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, FACET/UFGD

RESUMO

Os antibióticos denominados de Fluoroquinolonas (FQs) representam a classe de substâncias de suma importância no combate de microrganismos causadores de diversas infecções. Entretanto, o amplo espectro de atividade bacteriana, que lhes conferem alta toxicidade, exige que destas fluoroquinolonas sejam rigorosamente controladas. Assim, tanto sua administração oral quanto aos seus resíduos em alimentos de origem animal necessitam de um controle meticuloso. Diante deste contexto, neste trabalho foi utilizado técnicas eletroanalíticas para detectar, individualmente e simultaneamente, as fluoroquinolonas Ciprofloxacina (CIPRO) e Enrofloxacin (ENRO), mediante a oxidação de seus grupos eletroativos. Para esta finalidade, utilizou-se as técnicas de voltametria de onda quadrada (VOQ), voltametria cíclica (VC) e a voltametria de varredura linear (LSV) para estudar o comportamento voltamétrico e encontrar as melhores condições de trabalho. As melhores respostas voltamétricas foram obtidas utilizando a técnica de VOQ na presença do surfactante DSS que proporcionou picos ligeiramente separados e mais intensos, possibilitando o desenvolvimento de uma metodologia de determinação dessas FQs.

Palavras-chave: Eletroanálise; Fluoroquinolonas; Enrofloxacin; Ciprofloxacina.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Antibióticos FQs e aplicações na medicina humana e animal

Atualmente, as fluoroquinolonas (FQs) representam a classe dos agentes mais importantes empregadas no arsenal antimicrobiano [1-6]. É empregada na medicina humana no tratamento de mais de 800 milhões de pacientes, no qual pode variar desde o tratamento de infecções do trato urinário, aparelho respiratório, trato gastrointestinal, pele, tecidos moles, infecções articulares, ósseas e doenças sexualmente transmissíveis [3-5]. Na medicina veterinária, o tratamento abrange equinos, bovinos, suínos, caninos, felinos, cuniculares e píceos, sendo utilizadas no combate da mastite, metrite, pododermatite, enterites secundárias, infecções urinárias, colibacilose, salmonelose, pasteurelose, pleuropneumonia, rinite atrófica, pneumonia, enzoótica e broncopneumonia [2, 5-9].

1.2 Efeitos colaterais

Com a crescente utilização desta classe de antibióticos, tem se observado um grande número de pacientes com algum tipo de efeito colateral [9-10]. Estes sintomas têm sido associados a efeitos graves aos sistemas músculo-esquelético, cardiovascular, nervoso central e nervoso periférico, circulatório, endócrino, gastrointestinal, urinário, ao fígado, ao cérebro, a pele e aos sistemas sensoriais [6-11]. As crianças e os idosos são os mais afetados e sofrem maiores efeitos colaterais, quando a ingestão destes medicamentos. Para alguns pacientes, a toxicidade pode prolongar-se por semanas ou meses após a interrupção do tratamento, entretanto, para outros os sintomas podem persistir por vários meses ou anos, contudo em alguns casos, uma única dose é o suficiente para provocar reações adversas. No entanto, recentes estudos possibilitam uma ótima combinação entre às propriedades antibacterianas e a potência, controlando suas propriedades, tornando sua ação eficaz e minimizando seus efeitos negativos [7-8].

1.3 Ciprofloxacina

A Ciprofloxacina (CIPRO, Figura 1) é uma das fluoroquinolonas de maior importância no tratamento de inúmeras doenças infecciosas. Esta substância tem sido administrada para o tratamento de infecções bacterianas urinárias, ósseas, pele, tecidos moles, respiratórias, cancróide, gastroenterite bacteriana, gonorréia e prostatite bacteriana, diarreia, pneumonia, de uretrite gonocócica, de conjuntivite bacteriana e úlcera [5, 9]. Sua forma de absorção é por via oral, através do trato gastrointestinal, com uma absorção de 70%, atingindo uma concentração máxima de uma a duas horas após a administração de uma dose de 500 mg. O seu principal meio de excreção é a via urinária, mas pode também ser metabolizada no fígado, excretada pela via biliar ou por secreção na mucosa intestinal. Após a administração oral, 40 a 50% da forma

inalterada do medicamento é excretada via urinária nas primeiras vinte e quatro horas sendo apenas 15% pode ser excretada como metabolitos. Além disso, pode ocorrer uma excreção fecal nos cinco dias seguintes, cuja concentração atingida é cerca de 20 a 35% [5, 13].

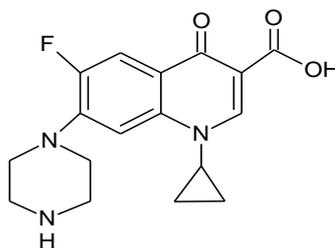


Figura 1 - Fórmula estrutural da fluoroquinolona Ciprofloxacina.

Neste contexto, alguns estudos reportam a determinação desta FQ. Entre estes trabalhos, destaca-se Nawaz e colaboradores [14], que estudaram a interação da CIPRO com DNA em um biosensor eletroquímico. O mecanismo de ligação da CIPRO foi elucidado usando mecanismo de corrente constante, através das técnicas potenciométrica e voltamétrica de pulso diferencial sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA [14].

1.4 Enrofloxacin

A Enrofloxacin (ENRO, Figura 2), conhecida como Baytril® tem sido aplicada para tratamento animal, sendo que seu destaque ocorre no tratamento de infecções em animais de pequeno e grande porte. Isto pode ser justificado pelo fato de ser a primeira fluoroquinolona desenvolvida como medicamento na medicina veterinária. Além disso, é um composto de amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, a qual é aprovada nos Estados Unidos pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de doenças bovinas respiratórias associadas com *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus* [15-16]. A ENRO também pode ser usada no tratamento de infecções dérmicas, infecções entéricas, infecções de ouvido, infecções geniturinárias e infecções pós-operatórias decorrentes de castrações, laparotomias e lesões acidentais. A ingestão da ENRO pode ocorrer por via oral ou intravenosa, todavia a mesma pode ser excretada por vias urinárias [15-17].

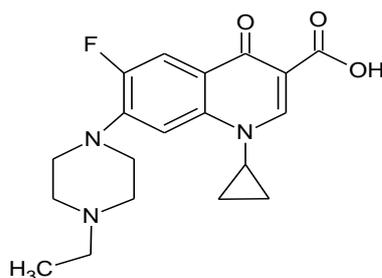


Figura 2 - Formula estrutural da fluoroquinolona Enrofloxacin.

Entre os trabalhos reportando a determinação da ENRO, destaca-se o artigo de Navalón e colaboradores [18], os quais proporam a determinação desta FQ em formulações comerciais e amostras de urina canina na presença do seu metabolito CIPRO. Neste trabalho, os autores empregaram a voltametria de redissolução adsortiva e métodos de calibração univariada. Os autores relatam que ambos os métodos foram aplicados com sucesso na análise de formulações comerciais e amostras de urina de cães e determinação da ENRO [18].

1.5 Métodos voltamétricos de análise

A voltametria representa um conjunto de técnicas eletroquímicas que podem ser utilizadas para obter informações qualitativas e quantitativas de uma grande variedade de substâncias eletroativas. Essas informações são obtidas mediante obtenção de curvas de corrente versus (*vs*) potencial, registradas durante a eletrólise da espécie em uma célula eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos, sendo um deles um microeletrodo (eletrodo de trabalho, ET) e o outro um eletrodo de superfície relativamente grande (um eletrodo de referência, ER). O potencial é aplicado entre os dois eletrodos, ET e ER, em forma de varredura, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. Um gráfico de corrente *vs*. Potencial é obtido e a esse dá-se o nome de voltamograma [18, 19]. Estudos encontrados na literatura revelam que a voltametria pode ser uma importante ferramenta usada na determinação de diversas substâncias, entre essas as FQs [5]. Portanto, em uma perspectiva de controle, devido ao risco para a saúde humana, o monitoramento de resíduos de FQs tanto em alimentos consumidos pelos humanos quanto em amostras biológicas, como urina, sangue, entre outras. Com isso, é de grande relevância o desenvolvimento de programas de vigilância constante para poder monitorar os índices destas substâncias nestas matrizes [20, 21].

Portanto, é de fundamental importância o desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos, como uma ferramenta valiosa para atender os requisitos básicos que envolve a determinação destes fármacos em tecidos animais e em amostras biológicas. Além disso, o controle da presença destes medicamentos em amostras de sangue, leite, plasma e urina por técnicas eletroanalíticas pode fornecer resultados relevantes a fim de quantificar o percentual do medicamento que não sofreu transformação biológica após a sua ingestão [3, 22-23].

2.0 METODOLOGIAS

2.1 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato da DropSens (modelo μ Stat 400) acoplado a um microcomputador para aquisição dos dados. O sistema de eletrodos foi composto por um eletrodo auxiliar de fio de Pt, um eletrodo de

referência de Ag/AgCl e como eletrodo trabalho o eletrodo de carbono vítreo (ECV). A célula eletroquímica, com capacidade máxima de 10 mL, continha uma tampa de teflon com orifícios para o acoplamento dos eletrodos.

Para registro dos voltamogramas, introduziu-se o eletrodo de carbono vítreo na célula eletroquímica contendo 5,00 mL do tampão (pH desejado). A solução eletrolítica foi submetida a agitação por uso de um agitador magnético (IKA, modelo Color Squid). Após esse processo, a solução foi desoxigenada via borbulhamento de nitrogênio gasoso por 10 minutos e, logo a seguir, o borbulhamento foi interrompido e registrou-se os voltamogramas empregando-se as técnicas voltamétricas de VC, LSV e VOQ.

2.2 Preparo dos eletrólitos

Preparou-se os seguintes eletrólitos de suporte, tampão acetato 0,04 mol L⁻¹ preparado pela mistura de acetato de sódio anidro (Merck) e ácido acético (Merck), o tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ preparado com fosfato de sódio dibásico mono-hidratado (Merck) e fosfato de sódio dibásico di-hidratado (Merck) e o tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ preparado com ácido acético (Fluka), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck). O ajuste do pH desejado foi realizado com ácido clorídrico (Vetec) ou hidróxido de sódio (Vetec), ambos na concentração de 0,10 mol L⁻¹, sendo o intervalo de pH estudado entre 3,0 e 9,0.

Posteriormente, estes eletrólitos suporte foram testados em uma célula eletroquímica contendo 5,00 mL do tampão analisado (pH desejado), utilizando o sistema de medidas eletroquímico apresentado no item 2.1. O intervalo de varredura para cada medida de potencial foi estabelecido de acordo com a visualização do melhor perfil voltamétrico entre cada medida.

2.3 Preparo das soluções padrão

A solução estoque do padrão de ENRO ($1,00 \times 10^{-3}$ e $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) foi preparada dissolvendo-se quantidade apropriada do sólido em água deionizada obtida em um sistema de Milli-Q (Millipore, modelo Simplicity). Já a solução estoque do padrão de CIPRO ($1,00 \times 10^{-3}$ e $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) foi preparada mediante pesagem de uma quantidade apropriada do sólido e dissolvida em ácido acético (Vetec) e em seguida, diluída em volume apropriado de água deionizada. Os padrões das fluoroquinolonas utilizados nos experimentos foram obtidos da Sigma-Aldrich, ambos com grau de pureza de 98,0%.

2.4 Preparo dos surfactantes

Os surfactantes lauril sulfato de sódio (LSS), cloreto de tetraetil amônio (CTEA), 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 com os padrões preparados em concentração de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A preparação foi realizada

mediante dissolução de quantidade apropriada do sólido em água deionizada obtida em um sistema de Milli-Q (Millipore, modelo Simplicity).

3.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Estudos das técnicas voltamétricas

Inicialmente, avaliou-se o comportamento voltamétrico das fluoroquinolonas ENRO e CIPRO por meio das técnicas voltamétricas, sendo estas a VC, VVL e VOQ. Assim, na Figura 3 (I) é apresentado os voltamogramas registrados com o uso da técnica de voltametria cíclica, bem como comparação do perfil voltamétricos destas FQs com o uso da LSV (Figura 3 II). Em ambos os voltamogramas, o comportamento voltamétrico das FQs foi avaliado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV), empregando como eletrólito suporte tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0.

Para os voltamogramas supracitados é apresentado na Figura 3 (I e II), verifica-se a inexistência de picos, para registro de voltamogramas de apenas o eletrólito suporte (voltamogramas A). Na Figura 3 (I) e (II) (voltamogramas B) verifica-se a ocorrência de um pico de oxidação em potencial de 1,16 V, atribuído a oxidação de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO após detecção individual dessa substância. Da mesma forma, na Figura 3 (I) e (II) (voltamogramas C), observa-se um pico anódico em potencial de 1,26 V, atribuído a oxidação eletroquímica de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO para detecção individual desta FQ.

Como foi observado, ENRO e CIPRO, exibem picos de oxidação em potenciais de 1,16 V (Figura 3 B) e 1,26 V (Figura 3 C), respectivamente, quando analisadas individualmente. Assim, testou-se a possibilidade de oxidação eletroquímica de ambas as FQs simultaneamente com objetivo de propor um método de determinação conjunta dessas substâncias. A Figura 3 (I D) e (II D) reúne os voltamogramas registrados para oxidação eletroquímica e detecção simultânea de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO e CIPRO. Exceto para a oxidação da CIPRO (Figura 3 II, voltamograma D), cujo potencial deslocou levemente para região mais positiva, em potencial de aproximadamente 1,28 V, não houve variação significativa do potencial para os demais picos obtidos com a VC e oxidação simultânea da ENRO e CIPRO (Figura 3 I, voltamograma D) bem como da oxidação da ENRO via VVL (Figura 3 II, voltamograma D). Destaca-se ainda que, mesmo sendo perceptível a presença de dois picos para análise simultânea dessas FQs (Figura 3 I e II, voltamogramas D), não houve separação satisfatória que permita a detecção de ambas as FQs em uma mesma amostra. Além disso, pode ser observado nos voltamogramas da Figura 3 (I), que as FQs ENRO e CIPRO 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.

Diante desses resultados, também é possível verificar que houve uma diminuição considerável da intensidade da corrente de pico provocada, possivelmente, pela proximidade dos picos e a ausência de seletividade nestas condições de análises. Assim, os estudos posteriores foram conduzidos com o objetivo de contornar estes problemas e propor uma metodologia alternativa para detecção simultânea dessas FQs.

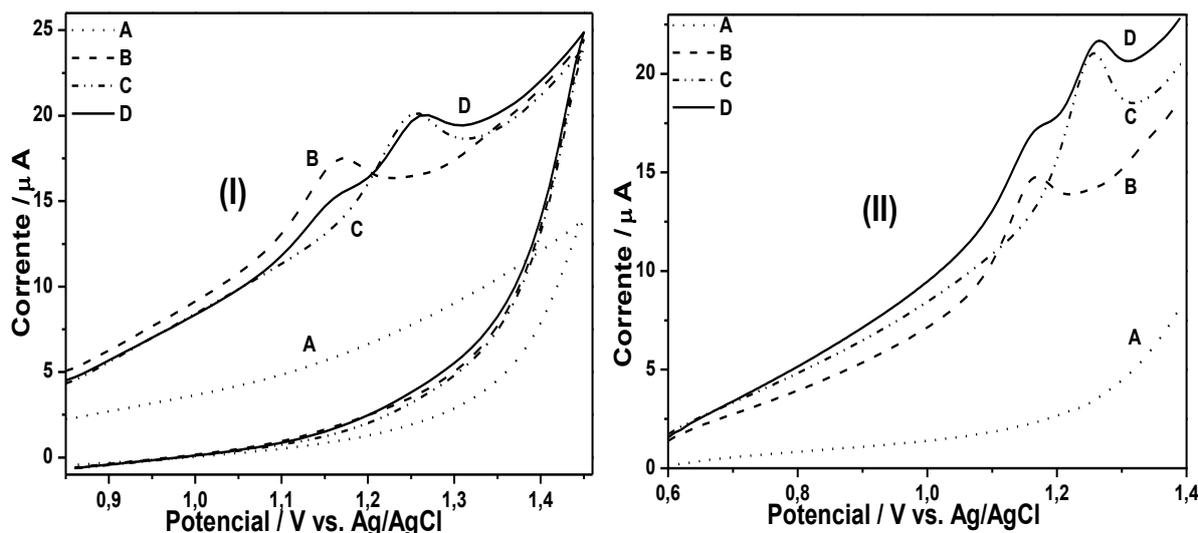


Figura 3 - (I) Voltamogramas Cíclicos e (II) Voltamogramas de Varredura Linear registrados para oxidação eletroquímica de ENRO e CIPRO, sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), nas seguintes condições: (A) Eletrólito suporte; (B) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO (C) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ CIPRO; (D) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO e $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO. Condições: $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.

Nos voltamogramas da Figura 4, são apresentados os estudos realizados com a técnica de VOQ, os quais foram obtidos sobre a superfície do ECV, empregando como eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0. Na presença de apenas o eletrólito suporte, verifica-se a inexistência de pico em todo intervalo de potencial de varredura (Figura 4, voltamograma A). Após a adição de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da ENRO, na célula eletroquímica, observa-se a presença de um pico anódico em potencial de 1,16 V (Figura 4, voltamograma B). Similarmente, com a adição de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da CIPRO na célula eletroquímica contendo uma nova solução de eletrólito suporte, verifica-se a presença de um pico de alta intensidade em potencial de 1,21 V (Figura 4, voltamograma C), correspondente a oxidação dessa FQ.

Para a detecção simultânea de ambas as FQs verificam-se, mesmo com difícil perceptibilidade, na Figura 4 (voltamograma D), um pico com baixa intensidade em potencial de 1,16 V atribuído a oxidação da ENRO e um segundo pico, melhor definido, em potencial de

1,21 V, atribuído à oxidação da CIPRO. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura [29-30], para estudos eletroquímicos envolvendo as FQs LEVO e NOR, em que os autores apontam que o processo de oxidação ocorre no grupo piperazinil presente na maioria dessas substâncias.

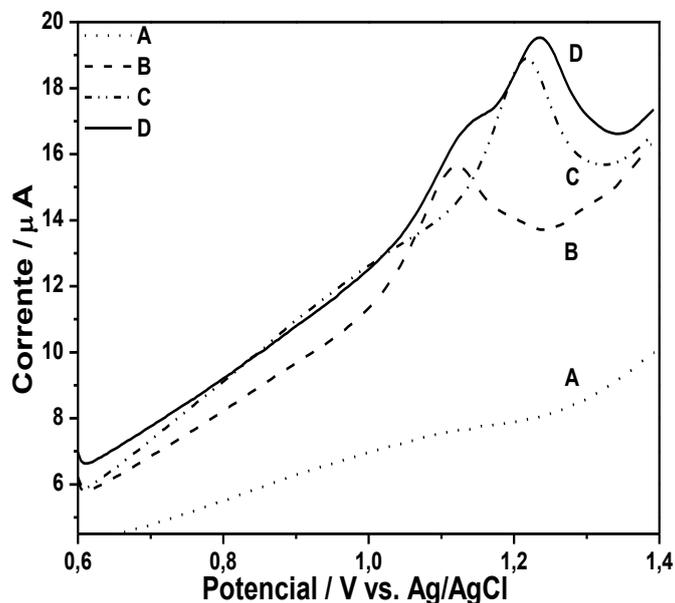


Figura 4 - Voltamogramas de onda quadrada, registrados para oxidação eletroquímica de ENRO e CIPRO sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), nas seguintes condições: (A) Eletrólito de suporte; (B) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO (C) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO; (D) $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO. Condições: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 40 \text{ mV}$ e $E_s = 4 \text{ mV}$.

Na Figura 5, pode-se verificar a análise comparativa realizada com as técnicas LSV (Figura 5, voltamograma A), VC (Figura 5, voltamograma B) e VOQ (Figura 5, voltamograma C), com o objetivo de definir a melhor detectabilidade entre as técnicas. Neste caso, novamente a oxidação eletroquímica de ambas as FQs foram realizadas em concentração de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com início da varredura de potencial na direção anódica em intervalo entre 0,80 e 1,45 V vs. Ag/AgCl, utilizando o tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0 como eletrólito suporte. Nestas condições de análises e considerando os dois modos de perturbação do eletrodo de trabalho, verifica-se que, dentre as técnicas voltamétricas avaliadas, nota-se que a VOQ proporcionou melhor perfil voltamétrico, com picos melhores definidos e maior separação. Assim, a técnica de VOQ foi escolhida para estudos posteriores e os parâmetros inerentes ao sistema foram avaliados.

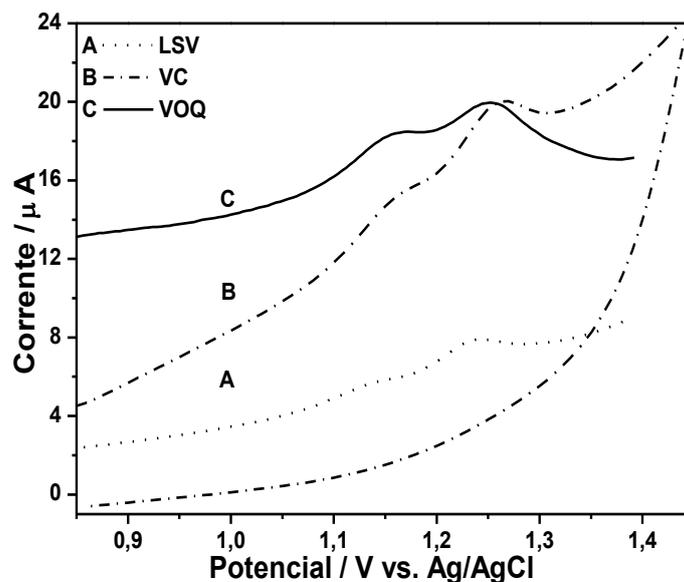


Figura 5 - Voltametria onda quadrada, voltametria de cíclica e voltametria de varredura linear registrados para oxidação eletroquímica de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ENRO e CIPRO sobre superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0. Condições: VOQ: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 40 \text{ mV}$ e $E_s = 4 \text{ mV}$. VC: $v = 150 \text{ mV s}^{-1}$. LSV: $v = 150 \text{ mV s}^{-1}$.

3.2 Estudos das condições experimentais

Após a escolha da técnica eletroquímica, estudou-se a influência do eletrólito de suporte, avaliados para os tampões acetato, fosfato e Britton-Robinson. Além disso, foi avaliado o efeito do pH na resposta da corrente de pico (I_p) bem como na resolução voltamétrica. BILIBIO (2014) [24] reporta que os estudos voltamétricos conduzidos com estes eletrólitos tem proporcionado melhores respostas para a determinação simultânea de duas FQs. De acordo com os resultados reunidos na Tabela 1 (para ENRO) e Tabela 2 (para CIPRO), é verificado que os maiores valores de I_p foram obtidos em tampão fosfato, pH 3,0, tanto na a CIPRO quanto para ENRO.

Tabela 1 - Influência do eletrólito suporte sobre a corrente de pico para oxidação de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da ENRO em tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e o tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sob um intervalo de pH entre 3,0 e 9,0.

| pH | Tampão Acetato (I_p) | Tampão BR (I_p) | Tampão Fosfato (I_p) |
|-----|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| 3,0 | $1,63 \pm 0,16$ | $1,44 \pm 0,22$ | $1,71 \pm 0,01$ |
| 5,0 | $0,73 \pm 0,01$ | $1,20 \pm 0,11$ | $0,57 \pm 0,05$ |
| 7,0 | $0,71 \pm 0,07$ | $1,06 \pm 0,06$ | $0,96 \pm 0,12$ |
| 9,0 | $0,66 \pm 0,05$ | $0,50 \pm 0,01$ | $0,57 \pm 0,06$ |

Tabela 2 - Influência do eletrólito suporte sobre a corrente de pico para oxidação de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO em tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e o tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sobre um intervalo de pH entre 3,0 e 9,0.

| pH | Tampão Acetato (I_p) | Tampão BR (I_p) | Tampão Fosfato (I_p) |
|-----|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| 3,0 | $1,56 \pm 0,16$ | $1,71 \pm 0,07$ | $1,94 \pm 0,18$ |
| 5,0 | $1,15 \pm 0,07$ | $0,95 \pm 0,14$ | $1,48 \pm 0,22$ |
| 7,0 | $1,44 \pm 0,11$ | $0,64 \pm 0,03$ | $0,48 \pm 0,04$ |
| 9,0 | $1,35 \pm 0,13$ | $0,29 \pm 0,01$ | $0,46 \pm 0,04$ |

Como já foi mencionado, os maiores valores de I_p foram obtidos em tampão fosfato em pH 3,0, entretanto o fator crucial para a detecção simultânea é a escolha do melhor perfil voltamétrico que, proporcione maior separação das FQs analisadas. Na Figura 6 são apresentados os voltamogramas registrados sobre a superfície de ECV nos tampões acetato, BR e fosfato em pH 3,0. Onde verifica-se nitidamente que o tampão fosfato em pH 3,0 exibe o melhor perfil voltamétrico além de uma melhor resposta em termos de intensidade de I_p .

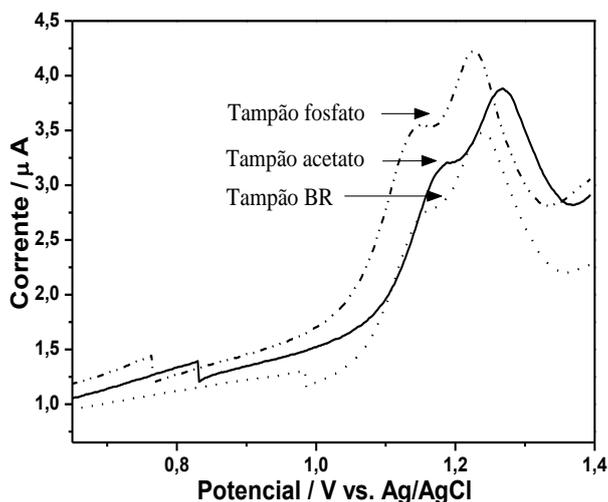


Figura 6 - Voltamogramas de VOQ registrado sobre superfície de ECV, para oxidação eletroquímica de ENRO e CIPRO simultaneamente com concentração de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampões acetato, tampão BR e tampão fosfato, em ambos na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Condições: $f = 25 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 20 \text{ mV}$.

3.3 Estudos dos parâmetros instrumentais

Na literatura [26-28], são encontrados trabalhos que otimizam os parâmetros instrumentais como forma de melhorar a detectabilidade e a sensibilidade de um sistema eletroquímico. Portanto, a variação dos parâmetros instrumentais influencia fortemente no sinal de excitação das técnicas voltamétricas. Assim, temos na técnica de VOQ, alguns parâmetros instrumentais, tais como frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f), o incremento de potencial (ΔE_s) e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}) que podem ser otimizados e, conseqüentemente, promover melhora na detectabilidade deste sistema. Já nas

técnicas de VC e LSV tem-se a velocidade de varredura de potencial (υ) como forma de influenciar significativamente na resposta voltamétrica. Posto isso, foram avaliados a influência de todos estes parâmetros instrumentais, buscando a melhor condição de trabalho avaliada, principalmente, sob a resolução voltamétrica e a intensidade de corrente das FQs ENRO e CIPRO.

Os parâmetros da técnica de VOQ foram estudados no intervalo de f (10-80 Hz), E_{sw} (10-100 mV) e ΔE_s (2-12 mV) (Tabela 3), cuja Tabela mostra os valores otimizados para o estudo das melhores condições de trabalho. Estes valores foram os que proporcionaram melhor intensidade de corrente de pico para detecção das FQs, CIPRO e ENRO, detectadas individualmente e simultaneamente, ambas na concentração de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 3 - Parâmetros instrumentais da técnica de VOQ otimizados durante estudos das melhores condições de trabalho para determinação individual e simultânea das FQs ENRO e CIPRO.

| Parâmetros | ENRO | CIPRO | CIPRO + ENRO |
|------------------------|------|-------|--------------|
| f (10-80 Hz) | 20 | 20 | 10 |
| E_{sw} (10-100 mV) | 25 | 25 | 25 |
| ΔE_s (2-12 mV) | 4 | 4 | 4 |

Para as técnicas de VC e LSV, o estudado foi realizado variando-se a velocidade de varredura de potencial (υ), cujos resultados podem ser observados na Tabela 4, a qual reúne os valores otimizados para cada técnica. Estes parâmetros refletem as melhores condições de trabalho em termos de intensidade de corrente de pico para ambas as FQs, analisadas individualmente e simultaneamente.

Tabela 4 - Parâmetros instrumentais das técnicas de VC e LSV otimizados durante estudos das melhores condições de trabalho para determinação individual e simultânea das FQs ENRO e CIPRO utilizando ECV.

| Técnica | Parâmetro | ENRO | CIPRO | CIPRO + ENRO |
|---------|----------------------------------|------|-------|--------------|
| VC | υ (V s^{-1}) | 0,15 | 0,20 | 0,15 |
| LSV | υ (V s^{-1}) | 0,15 | 0,15 | 0,15 |

Nestes estudos foram verificados que, as melhores respostas para as três técnicas voltamétricas foram obtidas em baixos valores de seus respectivos parâmetros. Isto foi verificado devido ao fato de que acima dos valores definidos, houve distorção dos picos, alargamento bem como presença de ruídos intensos, os quais se sobrepuseram ao potencial do pico de oxidação das FQs. Estes fatores comprometeram totalmente a identificação e o perfil dos voltamogramas, inviabilizando qualquer tentativa de medida precisa de corrente nestas

condições. Assim, a escolha dos parâmetros foi definida de acordo com a melhor I_p sem comprometer o perfil dos voltamogramas e, conseqüentemente, a resolução dos picos.

3.4 Influência de surfactantes na resposta voltamétrica

De acordo com resultados encontrados na literatura [26-28], os surfactantes catiônicos, aniônicos ou neutros têm sido empregados com sucesso para melhorar a separação de picos voltamétricos e intensificar a corrente de pico, bem como, contornando os problemas advindos da contaminação da superfície eletródica. Além disso, estes surfactantes podem ocasionar diminuição do efeito de matriz, aumentar a solubilidade na detecção do analito de interesse na presença do tensoativo e, ao mesmo tempo, aumenta a velocidade de transferência de carga.

Na Figura 7, é apresentado os VOQs registrados na presença dos surfactantes catiônicos, brometo de tetrabutil amônio (BTBA) (Figura 7, voltamograma **A**), cloreto de tetraetil amônio (CTEA) (Figura 7, voltamograma **B**), e apenas o eletrólito de suporte (Figura 7, voltamograma **C**), na ausência de surfactante (Figura 7, voltamograma **D**) e brometo de cetiltrimetil amônio (BCTA) (Figura 7, voltamograma **E**). Analisando os respectivos voltamogramas na presença e na ausência dos surfactantes catiônicos, pode-se verificar que os mesmos não promoveram nenhum efeito satisfatório tanto na resolução voltamétrica quanto na intensificação da I_p . Assim, constata-se que dentre os surfactantes catiônicos avaliados, nenhum deles proporcionou resultados promissores para ser usado como aditivo, na busca de melhoria advinda do perfil voltamétrico e intensidade da corrente de pico. Neste caso, verifica-se que o voltamograma registrado na ausência de surfactante (Figura 7 **D**), apresenta um perfil voltamétrico melhor definido que os demais voltamogramas.

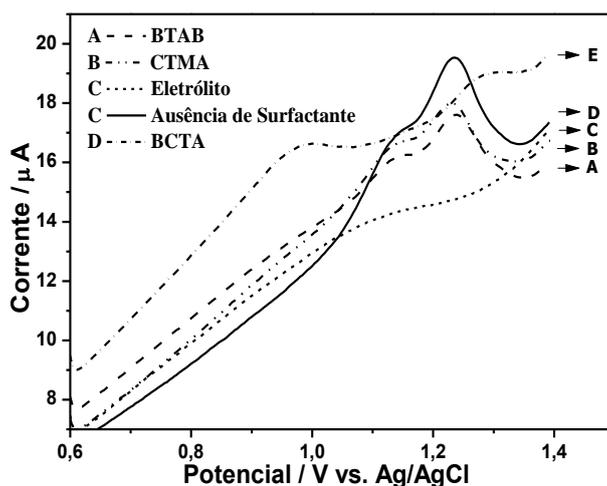


Figura 7 - Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do ECV, para oxidação simultânea de ENRO e CIPRO ambas na concentração de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato em pH 3,0 na presença de surfactantes catiônicos: (**A**) BTBA, (**B**) CTEA, (**C**) apenas o eletrólito suporte, (**D**) ausência de surfactante e (**E**) BCTA. Condições: $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 200 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 40 \text{ mV}$.

Deste modo, os estudos seguintes foram realizados na presença de surfactantes aniônicos, os quais são, apresentados na Figura 8, sendo identificados da seguinte forma: apenas com o eletrólito suporte (Figura 8, voltamograma **A**), na presença do surfactante lauril sulfato de sódio (LLS) (Figura 8, voltamograma **B**), dioctil sulfosuccinato de sódio (DSS) (Figura 8, voltamograma **C**), e na ausência de surfactante (Figura 8, voltamograma **D**). Além disso, inclui-se o registro de voltamograma na presença do surfactante neutro Triton X-100 (TX-100) (Figura 8, voltamograma **E**). De acordo com os voltamogramas, registrados na presença dos surfactantes LSS e TX-100, observa-se que esses não promoveram melhoria considerável no perfil voltamétrico. Contudo, com a adição do surfactante aniônico DSS, nota-se uma melhora significativa no perfil voltamétrico e um ligeiro aumento na intensidade da corrente de pico (Figura 8, voltamograma **B**). Segundo Trindade (2009) [26] este resultado está relacionado com a interação do surfactante com a superfície do eletrodo de trabalho, através de uma atração hidrofóbica, sendo a porção polar do surfactante orientada na direção da solução, cuja característica permite a interação com o analito de interesse e, conseqüentemente, melhora no perfil do voltamograma.

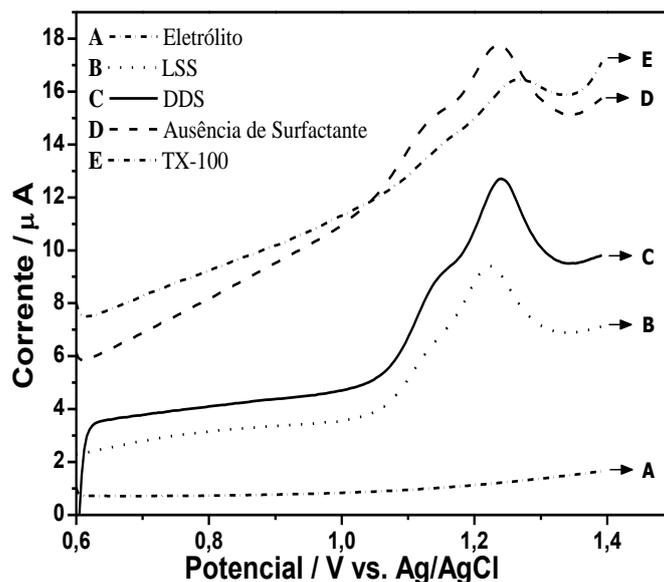


Figura 8 - Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do ECV, para oxidação simultânea de ENRO e CIPRO ambas na concentração de $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato em pH 3,0 na presença de surfactantes catiônicos: (**A**) apenas o eletrólito de suporte (**B**) LSS, (**C**) DSS, (**D**) ausência de surfactante e (**E**) TX-100. Condições: $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 200 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 40 \text{ mV}$.

Após definido o melhor surfactante, os estudos posteriores foram conduzidos na intensão de encontrar a concentração ideal do surfactante DSS. Utilizando as mesmas condições supracitadas, com exceção da concentração da ENRO que foi reduzida a $2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e

CIPRO para $1,48 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para este estudo variou-se a concentração do surfactante DSS no intervalo de $4,98 \times 10^{-6}$ a $3,38 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Na Figura 9, são reunidos apenas os voltamogramas que apresentaram os melhores perfis voltamétricos dentre as concentrações estudadas. Assim, observa-se que dentre os voltamogramas registrados nas diferentes concentrações, o melhor perfil voltamétrico foi obtido em concentração de $1,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante DSS (Figura 9, voltamograma **B**), indicando que o surfactante DSS promove benefícios na resolução voltamétrica, gerando picos ligeiramente resolvidos para a detecção simultânea de ambas as FQs.

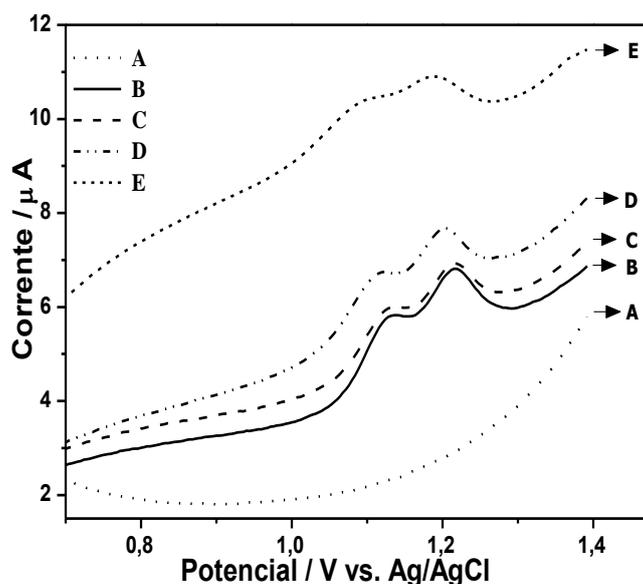


Figura 9 - Voltamogramas de onda quadrada registrados na presença do surfactante DSS para oxidação eletroquímica de $2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ENRO e $1,48 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO, simultaneamente sobre superfície de ECV em meio de tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Em apenas eletrólito de suporte (**A**), na presença do surfactante DSS nas respectivas concentrações de $1,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (**B**), $2,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (**C**), $4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (**D**) e na ausência de surfactante (**E**). Condições: $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 200 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 40 \text{ mV}$.

4.0 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, verificou-se que a técnica de VOQ e o uso do ECV, com o emprego do eletrólito suporte tampão fosfato em pH 3,0, proporcionaram a obtenção dos melhores resultados entre as demais condições analisadas. Além disso, os estudos dos parâmetros instrumentais geraram melhoria significativa nos perfis voltamétricos bem como na intensidade da corrente de pico para ambas as FQs. Todas estas condições possibilitaram a detecção individual e simultânea das FQs ENRO e CIPRO. Outra melhoria significativa foi obtida, com a utilização do surfactante dodecil sulfato de sódio, que auxiliou na resolução e

amplificação do sinal analítico para detecção simultânea das FQs, gerando picos ligeiramente separados com maior intensidade.

Por fim, os estudos apresentados neste trabalho evidenciaram a possibilidade de continuidade, com vistas, de aplicação do procedimento de deconvolução no intuito de gerar separação completa destes picos em processos simultâneos de detecção. Ademais, pretende-se aplicar as condições, aqui otimizadas, na determinação dessas FQs em amostras biológicas e formulações farmacêuticas contendo estes medicamentos para a detecção individual e simultânea destas FQs.

5.0 REFERÊNCIAS

[1] Pereira, O. G. F. Análise voltamétrica da Ciprofloxacina – Aplicação a medicamentos e a remediação; Dissertação (**Mestrado em Engenharia Química**), Portugal, Instituto Politécnico do Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2009.

[2] Machado, J. A. C. Oliveira, A. C.; Antônio, N. S.; Canesini, R.; Rocha, J. R.; Negri, D.; Pereira, D. M.; Quinolonas: Revisão de literatura, **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, FAMED, p. 1679-7353, n. 12, 2009.

[3] Trindade, M. A. G. Estudo do comportamento eletroquímico e determinação da Moxifloxacina através de técnicas voltamétricas, Dissertação (**Mestrado em Química**), Campo Grande, UFMS, 2004.

[4] Rodrigues, C. D. Estudo da Redução Eletroquímica do Antibiótico Norfloxacina; Dissertação (**Mestrado em Química**), Campo Grande, UFMS, 2003.

[5] Souza, F. C. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclastrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente; Dissertação (**Mestrado em Química**), Rio de Janeiro, PUC-Rio, 2008.

[6] Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Obtido em http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/infeccao.html, Acesso em Janeiro de 2014.

[7] Ouro Fino; Obtido em: <http://www.ourofino.com/saudeanimal/ruminantes/produtos/antimicrobianos/norflomax.html>, Acesso em Fevereiro de 2014.

[8] Hooper, D. C.; Wolfson J. S. The Fluoroquinolones: Pharmacology, Clinical Uses, and Toxicities in Humans, **Antimicrob Agents Chemother**, p. 716-721, v. 28, 1985.[9]

Ciprofloxacina Bulas medicas obtido em:
<http://www.bulas.med.br/bula/5566/ciprofloxacina.htm>; Acesso em janeiro de 2014.

[10] Burke, A.; Cunha, M. D. Antibiotic side Effects, Infectious Disease Division, Winthrop-University Hospital, **Medical Clinics of North America**, p. 149-185, n.1, v. 85, 2001.

[11] Bartlet, J. G.; Breiman R. F.; Mandell L. A.; File T. M. Community-Acquired Pneumonia in Adults: Guidelines for Management, **Clinical Infectious Diseases**, University of Chicago, p. 811-838, n. 26, 1998.

[12] Rubinstein, E. História das quinolonas e seus efeitos; Quimioterapia, University School of Medicine de Israel, p. 3-8, v. 47, 2001.

[13] Pereira, A. M. P. T. Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde humana, Dissertação (**Mestrado em Saúde Pública**), Coimbra, Universidade de Coimbra, 2009.

[14] Nawaz, H.; Rauf S.; Akhtar K.; Khalid A. M. Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin–DNA interaction, **Analytical Biochemistry**, 354, 28-34, 2006.

[15] Otero, J. L.; Mestorino, N.; Errecalde, J. O. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso Exclusivo en Veterinaria Parte I: Química, Mecanismo de Acción, Actividad, Antimicrobiana Resistência Bacteriana, **Analecta Veterinaria**, p. 31-41, n. 1, v. 21, 2001.

[16] Langonil, H.; Araújo, W. N.; Silva A. V.; Souza, L. C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação, UNESP, **Instituto de Biologia**, p.177-180, n. 2, v. 67, 2000.

[17] Flammer, K. Uso da Enrofloxacin (Baytril®) em psitacédeos; Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade da Carolina do Norte, Carolina do Norte, EUA; Trad. do Folheto Third International, **Veterinary Symposium on Baytril: Practicing veterinarian**, p. 107-109.

[18] Navalon, A.; Blanc, R.; Reyes, L.; Navas, N.; Vilchez, J. L. Determination of the Antibacterial Enrofloxacin by Differential-Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry, **Analytical Chimica Acta**, p. 83-91, v. 454, 2002.

[19] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentos Química Analítica; Tradução da 8ª edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo, p. 227-240, 2006.

[20] Hagmar, L.; et. al. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage; **Cancer Research**, v. 54, p. 2919-2922, 1994.

[21] Sverko, E.; Muir, D. Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal; **Analytical Chemistry e bioanalíticos**, v. 386, p. 769-789, n. 4, 2006.

- [22] Golet, M. E.; Strehler, A.; Alder, A. C.; Giger, W. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction; **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5455-5462, 2002.
- [23] Samanidou, V. F.; Demetriou, C. E.; Papadoyannis, I. N. 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.
- [24] Bilibio, U. Determinação eletroanalítica simultânea das fluoroquinolonas, Levofloxacina e Norfloxacina, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução; Dissertação (**Mestrado em Química**), UFGD, Dourados, 2014.
- [25] Ribeiro, W. F. Análise de traços do pesticida carbendazim por voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, Dissertação (**Mestrado em Química**); UFPB, João Pessoa, 2009.
- [26] Trindade, M. A. G. Métodos eletroanalíticos e cromatográficos aplicados na análise de corantes usados como marcadores em combustíveis, Tese (**Doutorado em Química**), UNESP, Araraquara, 2009.
- [27] Bilibio, U.; Oliveira, L. H.; Ferreira, V. S.; Trindade, M. A. G. Enhanced simultaneous electroanalytical determination of two fluoroquinolones by using surfactant media and a peak deconvolution procedure, **Microchemical Journal**, v. 116, p. 47-54, 2014.
- [28] Caramit, R. P.; Andrade, A. G. F.; Souza, J. B. G.; Araujo, T. A.; Viana, L. H.; Trindade, M. A. G.; Ferreira V. S. 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.
- [29] Ghoneim, M. M.; A. Radi, A.; Beltagi, A. M. Determination of norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on glass carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 205-210, 2001.
- [30] 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.