

COMPARAÇÃO DE PROCESSAMENTOS MATEMÁTICOS DE DADOS VOLTAMÉTRICOS: APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FLUOROQUINOLONAS**Luiz H. de Oliveira^a, Lauro A. Pradela Filho^b, André L. Santos^b, Regina M. Takeuchi^b e Magno A. G. Trindade^{a,*}**^aFaculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados – MS, Brasil^bFaculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia, 38304-402 Ituiutaba – MG, Brasil

Recebido em 15/07/2015; aceito em 31/08/2015; publicado na web em 26/10/2015

MATHEMATICAL PROCESSING COMPARISON OF VOLTAMMETRIC DATA: APPLICATION WITH THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES. This paper describes a comparative study between the procedures of deconvolution and the second-order derivative of square wave voltammograms to achieve separation of the voltammetric peaks of levofloxacin (LEVO) and norfloxacin (NOR), for their simultaneous quantification in urine samples. The obtained results indicate that the use of second-derivative voltammograms coupled with carbon screen-printed electrodes is the most efficient approach for completely separating the voltammetric peaks of LEVO and NOR. In addition, this approach has produced detection limits lower than 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a wide linear range for both drugs. The proposed method was successfully used to simultaneously determine LEVO and NOR in spiked human and bovine urine samples with recovery percentages close to 100% for all analyzed samples.

Keywords: fluoroquinolones; deconvolution; derivative; micellar medium; electroanalysis.

INTRODUÇÃO

A busca por agentes antibacterianos mais eficazes e de amplo espectro de ação tem impulsionado a síntese de uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana.¹⁻⁴ Esta busca produziu, ao longo das últimas décadas, um notável avanço nas pesquisas e nos processos de produção de novos antibióticos, o que culminou no desenvolvimento de fármacos cada vez mais eficientes e seguros. Dentre os antibióticos considerados modernos, destacam-se as fluoroquinolonas (FQs), que são fármacos antimicrobianos sintéticos amplamente empregados tanto na medicina humana quanto veterinária. Os principais representantes desta classe de antibióticos são: ciprofloxacina, norfloxacina (NOR), levofloxacina (LEVO) e a enrofloxacina, sendo esta última de uso exclusivo na medicina veterinária.⁴ As FQs apresentam alta capacidade de penetração na parede bacteriana, o que além de garantir elevada ação contra bactérias Gram-negativas, estende a ação das FQs à algumas bactérias Gram-positivas,⁴ tornando-as fármacos de amplo espectro de ação. Características atrativas adicionais das FQs incluem: baixa ligação proteica, alta biodisponibilidade e elevado tempo de meia-vida.⁴⁻⁷

Apesar da eficácia das fluoroquinolonas, o uso indiscriminado destes fármacos tem gerado preocupação em diversos segmentos da sociedade, pois induz o desenvolvimento de bactérias altamente resistentes, capazes de gerar graves infecções que podem evoluir para o óbito do indivíduo infectado. Ademais, a administração de FQs em animais destinados à alimentação humana é uma prática controversa, pois favorece a transferência de bactérias resistentes para os seres humanos,⁷⁻¹² além de poder contaminar o leite e a carne destinados ao consumo humano. O uso indiscriminado e em altas doses de antibióticos como as FQs pode ser tão nocivo e prejudicial à saúde humana quanto à própria doença que se pretende tratar.¹⁰⁻¹² Isso porque o uso contínuo e em altas doses das FQs favorece o aparecimento de graves efeitos colaterais que afetam diversos sistemas do organismo humano, tais como: musculoesquelético, cardiovascular, nervoso central e periférico, circulatório, endócrino, gastrointestinal e urinário.^{9,12-16}

Outro risco iminente do uso indiscriminado de antibióticos como as FQs é a elevada possibilidade de contaminação ambiental com estes compostos. O descarte inadequado de antibióticos fora do prazo de validade constitui uma fonte importante de introdução das FQs no meio ambiente. Além disso, FQs não metabolizadas são excretadas diretamente na rede de esgoto, atingindo as estações de tratamento que não são capazes de eliminar completamente estes fármacos. Desta forma, as FQs podem contaminar mananciais, rios e lagos e, caso estes sejam utilizados para abastecimento humano, as FQs retornam como contaminantes da água potável, uma vez que as estações convencionais de tratamento de água também não eliminam completamente as FQs.¹⁷⁻²⁰ A contaminação ambiental com estes antibióticos é muito preocupante, pois além de favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes; expõe o ambiente a doses pequenas e contínuas destes fármacos, cujos efeitos a médio e longo prazo sobre a saúde humana e sobre o meio ambiente são impossíveis de serem previstos.

Neste contexto, verifica-se que a contaminação de água e alimentos com resíduos de antibióticos, tais como as FQs, tem enorme potencial deletério sobre o meio ambiente e sobre a saúde humana. Desta forma, métodos analíticos capazes de determinar com elevada confiabilidade o acumulado não metabolizado destes fármacos em águas e alimentos de origem animal são extremamente necessários.^{11,18,19,21} Além de elevada confiabilidade, é altamente desejável que os métodos analíticos sejam simples, rápidos, de baixo custo, que permitam determinações simultâneas e que sejam aplicáveis a amostras mais complexas, tais como: solos, fluidos biológicos, tecido animal, etc.

Uma vez que não existem métodos analíticos oficiais para a quantificação de FQs em amostras ambientais ou de origem animal, diversos métodos analíticos alternativos têm sido propostos na literatura, sendo estes baseados em diferentes técnicas analíticas, tais como: espectrofluorimetria,^{22,23} cromatografia²⁴⁻³¹ e voltametria.³²⁻⁵¹ A voltametria destaca-se como uma técnica de baixo custo, com elevada sensibilidade, que permite análises rápidas e que é compatível com amostras turvas ou coloridas, o que diminui os requisitos quanto ao pré-tratamento de amostra. Assim, as técnicas voltamétricas são extremamente atrativas para a determinação de fármacos, como discutido em alguns artigos de revisão.⁵²⁻⁵⁴

*e-mail: magnotr@gmail.com

Apesar das características vantajosas das técnicas voltamétricas, estas apresentam limitações quanto à seletividade, isto porque a redução ou eletro-oxidação de grupos eletroativos estruturalmente semelhantes ocorre em potenciais muito próximos. Assim, analitos distintos, mas que possuam grupos eletroativos semelhantes fornecerão picos voltamétricos sobrepostos, impedindo a determinação individual de cada analito.⁵⁵⁻⁵⁷ Uma estratégia atrativa e ainda pouco explorada para a determinação simultânea de analitos com picos voltamétricos parcialmente sobrepostos é o uso de processamento matemático das curvas voltamétricas, tais como: procedimentos de deconvolução e métodos derivativos. A utilização destes procedimentos matemáticos é atrativa, pois permite que os sinais voltamétricos sejam satisfatoriamente separados sem a necessidade de reagentes químicos adicionais, como agentes complexantes, por exemplo.⁵⁸ Recentemente, nosso grupo demonstrou que o procedimento de deconvolução pode ser usado para a determinação simultânea de LEVO e NOR, empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada em meio micelar com um eletrodo de carbono vítreo.⁵¹ Apesar de permitir a separação dos picos voltamétricos destas duas FQs, a proximidade dos sinais à descarga do solvente/eletrólito dificultou a aplicação do método em amostras mais complexas. Exemplos adicionais da combinação de procedimentos matemáticos com as técnicas voltamétricas para fins analíticos incluem a determinação simultânea dos herbicidas atrazina e ametrina por voltametria de onda quadrada⁵⁵ e a utilização de métodos derivativos para a determinação de Pt em água do mar e sedimentos marinhos.⁵⁶

Desta forma, constata-se que os métodos matemáticos aplicados às curvas voltamétricas constituem uma estratégia simples, acessível e eficiente para determinações simultâneas de analitos cujos picos voltamétricos encontram-se parcialmente sobrepostos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é realizar um estudo comparativo entre o procedimento de deconvolução e o método derivativo, visando avaliar qual destes fornece a melhor separação entre os picos voltamétricos relativos à oxidação da LEVO (Figura 1A) e NOR (Figura 1B); com objetivo de determiná-las simultaneamente em amostras de urina humana e animal.

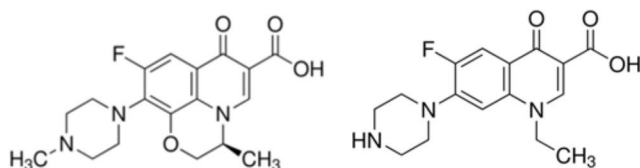


Figura 1. Fórmula estrutural das fluoroquinolonas LEVO (A) e NOR (B)

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

As soluções estoque das FQs, LEVO e NOR (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), foram preparadas nas concentrações de 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹, dissolvendo-se quantidades apropriadas de LEVO na mistura água/metanol (7:3, v/v) e NOR em água ultrapura (resistividade ≥ 18 MΩ cm) contendo 5,0% de ácido acético. As soluções de trabalho foram preparadas no intervalo de concentrações de 0,5 μmol L⁻¹ a 10,0 mmol L⁻¹, mediante a adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

Como eletrólito suporte utilizou-se o tampão Britton-Robinson (BR) preparado pela mistura de ácido acético (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), ácido bórico (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e ácido fosfórico (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 0,04 a 0,12 mol L⁻¹. O pH da solução tampão foi ajustado imediatamente antes de usá-la, empregando-se para isso uma solução

de hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) ou ácido clorídrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ambos na concentração de 0,20 mol L⁻¹. Diferentes proporções de metanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) entre 0,25 e 1,0% foram adicionadas ao eletrólito suporte, visando avaliar o efeito deste álcool sobre a resposta voltamétrica das FQs estudadas.

O efeito de surfactantes sobre a resposta voltamétrica das FQs estudadas foi avaliado adicionando-se soluções aquosas dos surfactantes lauril sulfato de sódio (LSS, Sigma, São Paulo, Brasil), dioctil sulfosuccinato de sódio (DSS, Sigma, São Paulo, Brasil) e brometo de cetil trimetil amônio (BCTA, Sigma, São Paulo) ao eletrólito de suporte.

Equipamentos

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um bipotenciostato portátil DropSens modelo μStat 400, acoplado a um notebook, e gerenciado pelo software Drop View. Foi empregada uma célula eletroquímica de compartimento único contendo 5 ou 10 mL de eletrólito suporte, a qual foi especialmente adaptada aos eletrodos de carbono impresso (ECIs, DRP-110, DropSens). Entre cada medida, um fluxo de nitrogênio foi mantido na solução do eletrólito de suporte por 30 s, visando eliminar o oxigênio dissolvido. A superfície dos ECIs foi lavada com etanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) após cada medida voltamétrica.

As medidas de pH foram realizadas em um pH-metro digital (ION/Modelo PHB 500). Para o processo de dissolução e homogeneização das amostras utilizou-se banho ultrassom (UNIQUE/Modelo USC 800). Para a separação das proteínas precipitadas nas amostras de urina e dos excipientes nas amostras de medicamentos utilizou-se uma centrífuga (Excelsa® II, Modelo 206 BL). A água ultrapura utilizada para o preparo de todas as soluções aquosas foi obtida por um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

Preparo das amostras de urina

As amostras de urina humana foram coletadas, com consentimento, de indivíduos saudáveis. Amostras de urina bovina foram coletadas de animais saudáveis com o consentimento dos criadores. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro e foram mantidas sob refrigeração a aproximadamente 3 °C até o momento das análises. Estas 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 μg mL⁻¹. Para a realização dos estudos de adição e recuperação das FQs, alíquotas de 3,00 mL das amostras de urina foram tratadas com 0,20 mL de metanol para promover a precipitação das proteínas. Posteriormente, estas amostras foram agitadas manualmente por 20 s e centrifugadas por mais 30 minutos a 2800 rpm (força centrífuga relativa = 1,575). Finalmente, alíquotas de 80, 40 ou 20 μL do sobrenadante enriquecido, respectivamente, com 50,00, 100,0 e 200,0 μg mL⁻¹ das FQs foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão BR. Os estudos de adição e recuperação foram realizados nestas soluções utilizando-se a técnica de voltametria de onda quadrada e o método de adição de padrão, sendo as determinações realizadas em triplicata.

Processamento matemático das curvas voltamétricas

As curvas voltamétricas foram tratadas matematicamente pelos métodos de deconvolução e pela determinação da segunda derivada da curva, visando determinar qual método promove uma separação mais eficiente entre os sinais voltamétricos da LEVO e da NOR. Ambos os processamentos matemáticos foram efetuados com o uso

do software Microcal Origin® (versão 8.5), após a correção da linha base dos voltamogramas. Para o procedimento de deconvolução, os picos foram considerados gaussianos, sendo necessário definir como parâmetros iniciais o número de picos e a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), a qual foi fixada em 75 mV. Para o método derivativo, foi necessário definir apenas a ordem da derivada como parâmetro inicial e, para melhor definição dos picos, realizou-se um novo ajuste da linha base.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos preliminares

Inicialmente, a resposta voltamétrica de uma mistura contendo LEVO e NOR, ambas na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, foi avaliada sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) e de um ECI, conforme apresentado na Figura 2.

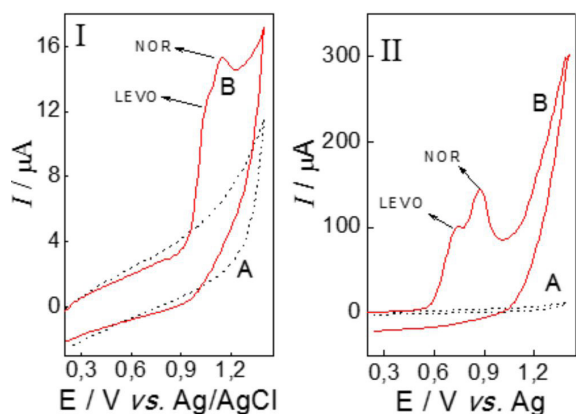


Figura 2. Voltamogramas cíclicos registrados em tampão BR $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 na ausência (A) e na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LEVO e NOR (B), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (I) ECV. (II) ECI

A Figura 2(I) mostra que, sobre o ECV, LEVO e NOR são oxidadas e produzem picos voltamétricos em 1,04 e 1,14 V, respectivamente. Não foram observados picos voltamétricos na varredura reversa para nenhuma das FQs estudadas, sugerindo que a oxidação destes fármacos envolva um processo de transferência eletrônica irreversível. Este comportamento está de acordo com o descrito na literatura,^{36,39} segundo a qual a oxidação de ambas FQs envolve o grupo piperazinil em um processo eletroquimicamente irreversível. A Figura 2(I) mostra ainda que os picos referentes à oxidação das FQs encontram-se sobrepostos entre si e ao processo de descarga do sistema solvente/eletrolito. Desta forma, verifica-se que nestas

condições experimentais não é possível determinar simultaneamente ambas as FQs, LEVO e NOR.

Conforme mostra a Figura 2(II), a substituição do ECV por um ECI produziu uma ligeira melhora na separação dos picos voltamétricos das duas FQs estudadas. Houve uma mudança significativa nos potenciais de pico de oxidação da LEVO (0,73 V) e da NOR (0,87 V) quando comparado aos resultados obtidos com o ECV. Esta mudança é atribuída aos diferentes eletrodos de referência empregados. Nos voltamogramas cíclicos registrados com o ECV empregou-se um eletrodo de referência de Ag/AgCl e nos voltamogramas registrados com o ECI, utilizou-se um eletrodo de pseudo-referência de Ag.⁵⁹ Apesar dos diferentes eletrodos de referência utilizados, pode-se concluir que a oxidação das FQs é mais favorável sobre a superfície do ECI, pois sobre este material eletródico a eletro-oxidação das FQs não está mais sobreposta à descarga do sistema solvente/eletrolito. Assim, o ECI promoveu a eletro-oxidação das FQs em potenciais significativamente menos positivos do que o processo de descarga do sistema solvente/eletrolito, tornando a determinação simultânea destes fármacos um pouco mais facilitada. Desta forma, devido ao melhor desempenho do ECI para a eletro-oxidação das FQs estudadas, este eletrodo foi empregado em todos os estudos subsequentes.

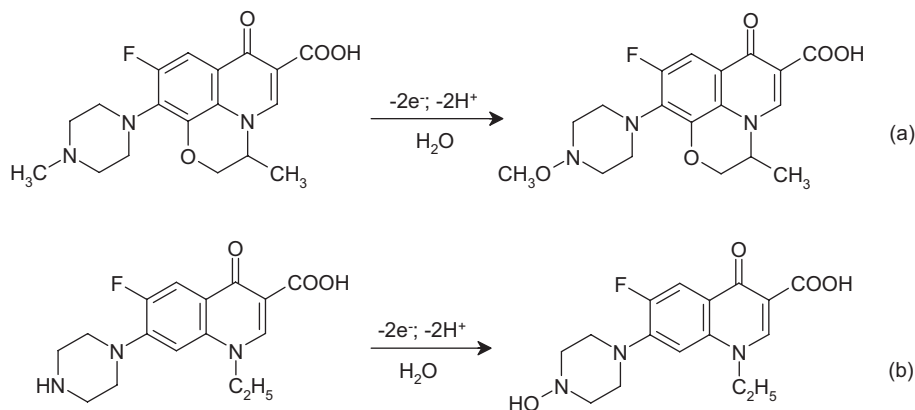
Embora o mecanismo da eletro-oxidação da LEVO e da NOR sobre eletrodos de carbono ainda não tenha sido completamente elucidado, alguns autores têm sugerido que estas FQs sejam eletro-oxidadas de acordo com as reações globais apresentadas no Esquema 1.^{43,60}

Estudos de otimização de parâmetros

Apesar do melhor desempenho do ECI, a separação dos picos da LEVO e da NOR obtida por voltametria cíclica não foi satisfatória e não permite a determinação simultânea destas FQs. As técnicas voltamétricas de pulso, como a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) são mais atrativas para fins analíticos. Além de maior sensibilidade, estas técnicas apresentam melhor resolução do que a técnica de voltametria cíclica. Assim, visando obter uma melhor separação entre os picos voltamétricos da LEVO e da NOR, as técnicas de pulso foram utilizadas, sendo os voltamogramas obtidos neste estudo apresentados na Figura 3.

A Figura 3 mostra que a separação de picos obtida com as técnicas de pulso foi melhor do que a obtida pela técnica de voltametria cíclica (Figura 2II). A VOQ foi a que apresentou a melhor resolução e maior intensidade de sinal. O melhor desempenho da VOQ pode ser atribuído a maior velocidade de varredura efetiva desta técnica, o que produz picos intensos e definidos.⁶¹ Com base nestes resultados, a técnica de VOQ foi adotada nos estudos posteriores.

A solução experimental empregada como eletrolito de suporte e o pH desta solução são fatores que também afetam o perfil voltamétrico e que,



Esquema 1. Vias de eletro-oxidação para: (a) LEVO e (b) NOR.^{43,60}

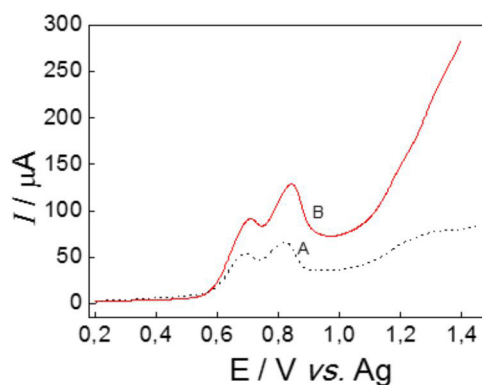


Figura 3. Voltamogramas registrados em presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LEVO e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NOR sobre superfície de um ECI em meio de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. (A) VPD ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $t_p = 10 \text{ ms}$) e (B) VOQ ($f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$)

portanto, podem melhorar a resolução voltamétrica. Visando melhorar a separação dos picos voltamétricos da LEVO e da NOR, diferentes eletrólitos de suporte foram avaliados. O eletrólito de suporte que forneceu a melhor separação de picos aliada a maior intensidade de sinal e melhor repetibilidade foi o tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Porém, mesmo este eletrólito não forneceu resolução voltamétrica suficiente para que a determinação simultânea de LEVO e NOR fosse realizada satisfatoriamente. Diferentes porcentagens de metanol foram adicionadas ao eletrólito de suporte, visando um aumento na intensidade de sinal e uma melhora na resolução voltamétrica. Os resultados deste estudo mostraram que a adição de $0,5\%$ (v:v) de metanol promoveu uma melhora na sensibilidade e na resolução voltamétrica sem comprometimento da repetibilidade. Assim, essa porcentagem de metanol foi mantida em todos os estudos posteriores. O efeito do pH do eletrólito de suporte sobre os valores de corrente de pico (i_p) e potencial de pico (E_p) para a eletro-oxidação das FQs estudadas é apresentado na Figura 4.

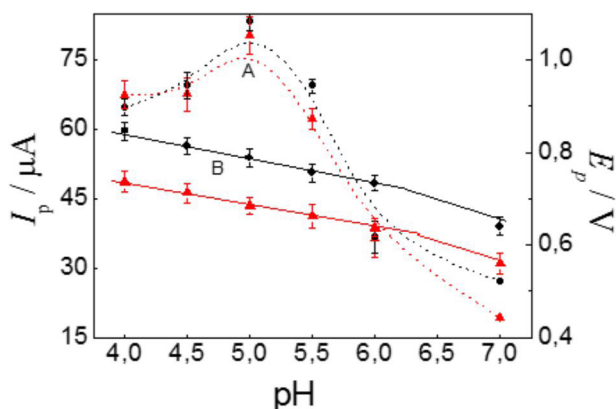


Figura 4. Influência do pH sobre os valores de i_p (A) e E_p (B) para eletro-oxidação de $53,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LEVO (▲) e $53,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NOR (●) sobre a superfície de um ECI em meio de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0 – 7,0) contendo $0,5\%$ de metanol. Condições voltamétricas: $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$

A Figura 4 mostra que os picos de oxidação de ambas FQs se deslocam para potenciais menos positivos com o aumento do pH, indicando que existem reações de protonação acopladas aos processos transferência eletrônica, o que é concordante com o observado na literatura.^{39,47} Por meio da Figura 4, pode-se observar ainda que a maior intensidade de corrente para ambas as FQs estudadas é obtida em pH = 5,0, o qual foi mantido constante nos estudos posteriores.

Ainda com o intuito de melhorar a separação entre os picos voltamétricos das FQs estudadas, diferentes surfactantes foram adicionados ao eletrólito de suporte. Além de serem capazes de aumentar a intensidade de sinal e melhorar a resolução voltamétrica, os surfactantes podem atenuar a adsorção de produtos ou intermediários da redução ou oxidação do analito, minimizando, portanto, a desativação da superfície do eletrodo de trabalho.⁶²⁻⁶⁸ Assim, no caso dos ECIs, os surfactantes podem aumentar o tempo de vida útil destes dispositivos. Hosseinzadeha *et al.*⁶⁹ observaram que a adição de um surfactante ao eletrólito de suporte produziu uma melhora na resolução voltamétrica e permitiu que ácido ascórbico e dopamina fossem determinados simultaneamente de maneira satisfatória. Caramit *et al.*⁷⁰ observaram que um meio micelar contendo um surfactante catiônico é eficaz para a determinação de simultânea de antioxidantes em amostras de biodiesel. Assim, os seguintes surfactantes: aniônico DSS, catiônico BCTA e neutro LSS foram adicionados à célula eletroquímica, em concentrações variando de 50 a $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a adição de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS à célula eletroquímica promoveu um considerável aumento na intensidade dos picos de oxidação de LEVO e NOR, embora não tenha produzido uma melhora significativa na separação dos picos. Os outros surfactantes avaliados não afetaram significativamente o perfil voltamétrico das FQs estudadas. Assim, os estudos voltamétricos subsequentes foram realizados na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS.

Os parâmetros operacionais da técnica de VOQ foram também submetidos a estudos de otimização, sendo obtida a seguinte condição otimizada: frequência (f) = 15 Hz ; amplitude de pulso (E_{sw}) = 30 mV e incremento de potencial (ΔE_s) = $4,0 \text{ mV}$. A Tabela 1 sumariza as condições obtidas após a otimização de todos os parâmetros estudados.

Tabela 1. Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para a determinação simultânea de LEVO e NOR por VOQ

Parâmetros estudados	Tipo ou intervalo testado	Otimizado
Técnica voltamétrica	VC, VPD, VOQ	VOQ
Eletrólito de suporte	Fosfato, BR, BR + metanol	BR + $0,50\%$ de metanol
Concentração do tampão	$0,04 - 0,12 \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$0,10 \text{ mol L}^{-1}$
Surfactantes	LSS, DSS e BCTA	LSS
Concentração do surfactante	$50,0 - 300,0 \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$	$100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$
pH (tampão BR)	$4,0 - 7,0$	$5,0$
Frequência (f)	$10 - 35 \text{ Hz}$	15 Hz
Incremento de potencial (ΔE_s)	$2,0 - 10 \text{ mV}$	$4,0 \text{ mV}$
Amplitude (E_{sw})	$10 - 60 \text{ mV}$	30 mV
Tempo de equilíbrio	$5 - 15 \text{ s}$	$7,5 \text{ s}$

Processamento matemático das curvas voltamétricas

Foi observado que após a otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais, obteve-se um aumento na intensidade dos picos voltamétricos da LEVO e da NOR, entretanto, não foi observada uma melhora significativa na separação entre os picos dessas FQs. Assim, mesmo após extensivos estudos de otimização de parâmetros, não foi possível obter uma condição na qual a determinação simultânea de LEVO e NOR pudesse ser feita de forma satisfatória. A sobreposição de picos para analitos estruturalmente semelhantes é uma situação muito comum e esta condição foi demonstrada nos estudos voltamétricos para redução das FQs, NOR, CIPRO e Ofloxacina³² e para a oxidação das FQs, NOR e LEVO.⁵¹ Nestes casos, o ganho de

resolução obtido por meio da otimização dos parâmetros voltamétricos, da variação do pH do eletrólito de suporte ou mesmo com a adição de surfactantes não é suficiente para separar completamente os picos voltamétricos dos analitos. Para estes casos, o processamento matemático das curvas voltamétricas torna-se extremamente atrativo, pois pode promover uma separação satisfatória sem a necessidade de reagentes químicos adicionais, permitindo a determinação simultânea de forma simples, rápida e com baixo custo. A Figura 5 apresenta os voltamogramas de onda quadrada registrados nas condições otimizadas (Tabela 1) na presença de $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada uma das FQs após o processamento matemático de deconvolução (Figura 5I) e derivativo de segunda ordem (Figura 5II).

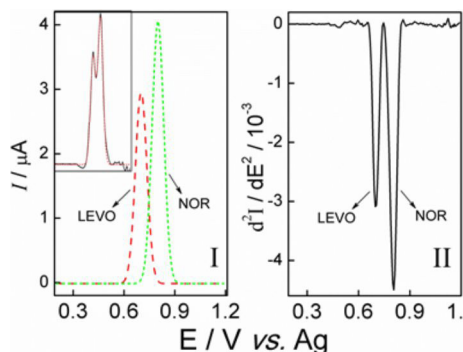


Figura 5. Voltamogramas de onda quadrada registrados nas condições otimizadas e submetidos a diferentes processamentos matemáticos. I) Procedimento de deconvolução; inserido: comparação entre a soma dos picos deconvoluídos e o voltamograma experimental. II) Segunda derivada da curva voltamétrica. Condições voltamétricas de acordo com a Tabela 1. $C_{LEVO} = C_{NOR} = 6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$

Na Figura 5I, verifica-se que o procedimento de deconvolução foi capaz de separar completamente os picos voltamétricos da LEVO e da NOR. Além disso, observa-se que a curva resultante da soma dos picos deconvoluídos se sobrepõe quase perfeitamente ao voltamograma experimental (Figura 5I inserido), indicando que os picos deconvoluídos realmente refletem os picos experimentais separados para cada uma das FQs. A separação dos picos obtida por meio da segunda derivada da curva voltamétrica também foi satisfatória, sendo obtidos picos estreitos e intensos. Assim, ambos os processamentos matemáticos promovem separação satisfatória entre os picos voltamétricos da LEVO e da NOR e ambos poderiam ser empregados para a determinação simultânea destes fármacos. O procedimento de deconvolução apresenta a vantagem de fornecer cada pico separado, assim, a determinação de parâmetros voltamétricos, tais como i_p , E_p , $W_{1/2}$ e área sob o pico, pode ser efetuada com grande precisão e exatidão. Por outro lado, este procedimento é mais demorado e mais dependente dos parâmetros inicialmente definidos (número de picos e $W_{1/2}$). Alguns dos parâmetros voltamétricos (i_p , $W_{1/2}$ e área sob o pico) são perdidos quando a segunda derivada da curva voltamétrica é utilizada, porém, a obtenção da segunda derivada é um procedimento extremamente simples, rápido, independente de qualquer parâmetro inicial e que tende a fornecer picos mais estreitos e intensos. Desta forma, caso a técnica voltamétrica seja utilizada para a determinação de parâmetros voltamétricos visando o estudo de mecanismos ou do número de elétrons envolvidos em um processo redox, o procedimento de deconvolução é o mais apropriado. Entretanto, caso o interesse seja puramente analítico, o procedimento derivativo é o mais adequado por ser mais simples e rápido. Como o objetivo deste trabalho é determinar simultaneamente LEVO e NOR em amostras de urina tanto humana quanto animal, optou-se por empregar o método derivativo nos estudos analíticos.

Curva de calibração

Empregando-se as condições previamente otimizadas, foram registrados voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de LEVO e NOR. Estes voltamogramas foram utilizados na construção de uma curva de calibração, sendo estes resultados apresentados nas Figuras 6I e 6II.

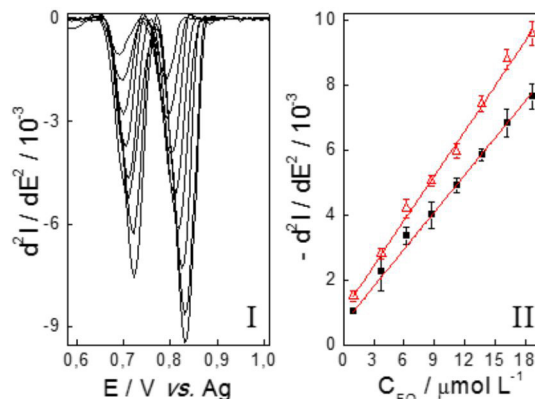


Figura 6. I) Segunda derivada dos voltamogramas de onda quadrada registrados nas condições otimizadas (Tabela 1) em presença de diferentes concentrações de LEVO e NOR no intervalo de 1,0 a $18,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. II) Curvas de calibração para LEVO (■) e NOR (Δ)

Para ambas as FQs, observou-se uma faixa linear de resposta no intervalo de concentração de $1,00$ a $18,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 6II. Os pontos apresentados nesta curva correspondem ao valor médio de três medidas. Os parâmetros obtidos para as curvas de calibração de cada uma das FQs são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de confiabilidade analítica obtidos a partir das curvas de calibração apresentadas na Figura 6II

Parâmetros	LEVO	NOR
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,00 – 18,6	1,00 – 18,6
Inclinação ($S_A, \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,380	0,459
Intercepto (μA)	0,650	1,053
DP* do intercepto	0,025	0,098
Coefficiente de correlação (r)	0,998	0,996
LD** ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,197	0,640

*DP - Desvio padrão. **LD - Limite de detecção.

A partir dos parâmetros apresentados na Tabela 2, verifica-se que a utilização da segunda derivada dos voltamogramas de onda quadrada não apenas separou eficientemente os picos de LEVO e NOR como também forneceu uma linearidade satisfatória ($r > 0,99$) para ambos os fármacos. Assim, constata-se que o uso de um ECI aliado ao tratamento derivativo de segunda ordem dos voltamogramas de onda quadrada permite que LEVO e NOR sejam simultaneamente quantificadas de forma simples, rápida e com baixo custo.

Aplicação do método

Visando avaliar a exatidão e aplicabilidade do método proposto, amostras de urina humana e bovina foram enriquecidas com quantidades exatamente conhecidas de LEVO e NOR. Estas amostras foram submetidas a estudos de adição e recuperação, empregando-se o método de adição de padrão. Todas as determinações foram

realizadas em triplicata e os resultados obtidos para a amostra de urina bovina enriquecida com 50 mg L⁻¹ de LEVO e NOR são apresentados na Figura 7.

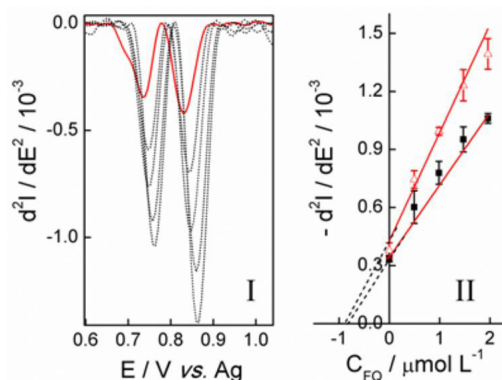


Figura 7. I) Segunda derivada dos voltamogramas de onda quadrada registrados nas condições otimizadas (Tabela 1). (—) Após a adição de 20 µL da amostra de urina bovina enriquecida com 50 mg L⁻¹ de LEVO e NOR. (⋯) Após sucessivas adições de 0,5 µmol L⁻¹ de LEVO e NOR. II) Curva de adição de padrão para LEVO (■) e NOR (△)

As Figuras 7I e 7II indicam que não são observados efeitos de matriz associados à amostra de urina bovina, uma vez que os valores de S_A para LEVO (0,373) e NOR (0,510) obtidos para a curva de adição de padrão foram muito próximos aos valores obtidos para a curva de calibração (Tabela 2). Assim, verifica-se que não existe nenhuma espécie proveniente da matriz biológica que produza picos voltamétricos sobrepostos aos picos da LEVO e NOR. Este comportamento foi observado também para a amostra de urina humana. Em todos os estudos de adição e recuperação realizados nas amostras de urina, foram obtidas curvas de adição de padrão com coeficientes de correlação próximos a 0,999, indicando que as determinações de LEVO e NOR nestas amostras, pelo método proposto, podem ser executadas com elevada confiabilidade. Os resultados dos estudos de adição e recuperação realizados nas amostras de urina humana e bovina enriquecidas com diferentes níveis de LEVO e NOR são apresentados na Tabela 3.

Conforme observado na Tabela 3, as porcentagens de recuperação variaram de 94 a 102% para LEVO e de 96 a 101% para NOR para ambas as amostras analisadas. Estes resultados são uma demonstração clara de que o método proposto apresenta exatidão satisfatória e que

pode ser empregado com êxito para a determinação simultânea de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina. Os valores de DPR obtidos foram relativamente baixos, demonstrando que a precisão apresentada pelo método também é satisfatória. Desta forma, verifica-se que o uso da segunda derivada dos voltamogramas de onda quadrada permite que LEVO e NOR sejam determinadas simultaneamente em amostras de urina com elevada confiabilidade sem a necessidade de procedimentos drásticos ou tediosos de pré-tratamento de amostra.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo entre os processamentos matemáticos de deconvolução e derivativo de segunda ordem aplicados à técnica de voltametria de onda quadrada para a determinação simultânea de LEVO e NOR em amostras de urina. Foi demonstrado que ambos os processamentos matemáticos são capazes de separar eficientemente os sinais voltamétricos destes fármacos, entretanto, o uso da segunda derivada é mais vantajoso para aplicações analíticas por ser mais rápido e simples e por fornecer picos mais estreitos e muito intensos. O método desenvolvido para a determinação simultânea de LEVO e NOR em amostras de urina combinou o uso da segunda derivada dos voltamogramas de onda quadrada ao uso de um ECI, o qual é um dispositivo de extrema praticidade, de baixo custo e que permite a miniaturização do sistema de detecção, tornando o método mais apropriado para aplicações práticas. O método desenvolvido apresentou valores de LD bastante atrativos tanto para LEVO quanto para NOR e o mesmo foi empregado com êxito para a determinação destes fármacos em amostras de urina humana e bovina enriquecidas. Assim, conclui-se que a estratégia apresentada neste trabalho para a determinação simultânea de LEVO e NOR pode ser estendida para a determinação simultânea de outras fluoroquinolonas, contribuindo, portanto, para a proteção da saúde humana e do meio ambiente por meio do monitoramento de resíduos destes fármacos em amostras biológicas, ambientais e alimentícias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento: FUNDECT (Proc.: 23/200.258/2014 e 23/200.680/2012), FAPEMIG (Proc: APQ-01557-13), CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio institucional e financeiro.

Tabela 3. Resultados dos estudos de adição e recuperação de LEVO e NOR em amostras de urina humana e bovina

Analito	Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado ^a (mg L ⁻¹)	Recuperado (%)	DPR (%)
LEVO	Urina humana	200	204 ± 6	102	0,9
		100	100 ± 6	100	0,6
		50	47 ± 3	94	2,0
	Urina bovina	200	193 ± 8	96	2,0
		100	97 ± 7	97	2,2
		50	46 ± 5	92	2,3
NOR	Urina humana	200	202 ± 9	101	0,2
		100	96 ± 4	96	2,6
		50	48 ± 6	96	2,3
	Urina bovina	200	199 ± 5	99	1,7
		100	98 ± 4	98	2,6
		50	48 ± 7	96	7,6

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

REFERÊNCIAS

- Zhanel, G. G.; Walkty, A.; Vercaigne, L.; Karlowsky, J. A.; Embil, J.; Gin, A. S.; Hoban, D. J.; *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* **1999**, *10*, 207.
- Zhanel, G. G.; Ennis, K.; Vercaigne, L.; Walkty, A.; Gin, A. S.; Embil, J.; Smith, H.; Hoban, D. J.; *Drugs* **2002**, *62*, 13.
- Ali, A. K.; *Ann. Epidemiol.* **2014**, *24*, 279.
- Silva, J. M. B.; Hollenbach, C. B.; *Arq. Inst. Biol. São Paulo* **2010**, *77*, 363.
- Bolon, M. K.; *Med. Clin. North Am.* **2011**, *95*, 793.
- Appelbaum, P. C.; Hunter, P. A.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 5.
- Stahlmann, R.; Lode, H.; *Drugs* **1999**, *58*, 37.
- Stahlmann, R.; *Toxicol. Lett.* **2002**, *127*, 269.
- Lipsky, B. A.; Baker, C. A.; *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*, 352.
- Kang, T. M.; Yuan, J.; Nguyen, A.; Becket, E.; Yang, H.; Miller, J. H.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3216.
- Reig, M.; Toldrá, F.; *Meat Sci.* **2008**, *78*, 60.
- Nelson, J. M.; Chiller, T. M.; Powers, J. H.; Angulo, F. J.; *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *44*, 977.
- Bartlett, J. G.; Dowell, S. F.; Mandell, L. A.; File, T. M.; Musher, Jr.; Fine, D.M.; *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 811.
- Owens Jr., R. C.; Ambrose, P. G.; *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 144.
- Bertino Jr., J.; Fish, D.; *Clin. Ther.* **2000**, *22*, 798.
- Cohen, J. S.; *Ann. Pharmacother.* **2001**, *35*, 1540.
- González-Hein, G.; Cordero, N.; García, P.; Figueroa, G.; *Rev. Chil. Infectol.* **2013**, *30*, 135.
- Cerniglia, C. E.; Kotarski, S.; *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1999**, *29*, 238.
- Dowling, G.; *Doctoral thesis*, Dublin Institute of Technology, Ireland, 2012.
- Pereira, L. A.; Jardim, I. C. S. F.; Fostier, A. H.; Rath, S.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 159.
- Blasco, C.; Picó, Y.; Torres, C. M.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 895.
- González, J. A.; Mochón M. C.; de la Rosa F. J.; *Talanta* **2000**, *52*, 1149.
- Stankova, M.; Stankov, D.; Milicevic, Z.; Veselinovic, D.; Djurdjevic, P.; *Spectrosc. Lett.* **1993**, *26*, 1709.
- Schneider, M. J.; Darwish, A. M.; Freeman, D. W.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586*, 269.
- Wagila, M.; Kumirskaa, J.; Stoltea, S.; Puckowskia, A.; Maszkowskaa, J.; Stepnowskia, P.; Białk-Bieli skaa, A.; *Sci. Total Environ.* **2014**, *493*, 1006.
- De Smeta, J.; Boussey, K.; Colpaert, K.; Sutter, P.; Paepe, P.; Decruyenaere, J.; Bocxlaer, J. V.; *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 961.
- Payán, M. R.; López, M. A. B.; Fernández-Torres, R.; González, J. A. G.; Mochón, M. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 332.
- Wong, F. A.; Juzwin, S. J.; Flor, S. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 765.
- Sousa, J.; Alves, G.; Campos, G.; Fortuna, A.; Falcão, A.; *J. Chromatogr. B* **2013**, *930*, 104.
- Samanidou, V. F.; Demetriou, C. E.; Papadoyannis, I. N.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 623.
- Boppana, V. K.; Swanson, B. N.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 808.
- Nia, Y.; Wanga, Y.; Kokotb, S.; *Talanta* **2006**, *69*, 216.
- Bagheria, H.; Afkhamib, A.; Panahia, Y.; Khoshafar, H.; Shirzadmehrb, A.; *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, *37*, 264.
- Shan, J.; Liu, Y.; Li, R.; Wu, C.; Zhu, L.; Zhang, J.; *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *738*, 123.
- Beltagi, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 1079.
- Ghoneim, M. M.; Radi, A.; Beltagi, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 205.
- Ibrahim, M. S.; Shehatta, I. S.; Sultan, M. R.; *Talanta* **2002**, *56*, 471.
- Navalón, A.; Blanc, R.; Reyes, L.; Navas, N.; Vílchez, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *454*, 83.
- Radi, A.; El-Sherif, Z.; *Talanta* **2002**, *58*, 319.
- Tamer, A.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *231*, 129.
- Vílchez, J. L.; Taoufiki, J.; Araujo, L.; Navalón, A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 465.
- Vílchez, J. L.; Araujo, L.; Prieto, A.; Navalón, A.; *Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 23.
- Goyal, R. N.; Rana, A. R. S.; Chasta, H.; *Bioelectrochemistry* **2012**, *83*, 46.
- Torriero, A. A. J.; Salinas, E.; Raba, J.; Silbe, J. J.; *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 109.
- Zhang, F.; Gu, S.; Ding, Y.; Li, L.; Liu, X.; *Bioelectrochemistry* **2013**, *89*, 42.
- Wen, W.; Zhao, D. M.; Zhang, X. H.; Xiong, H. Y.; Wang, S. F.; Chen, W.; Zhao, Y. D.; *Sens. Actuators, B* **2012**, *174*, 202.
- Radi, A. E.; Khafagy, A.; El-Shobaky, A.; El-Mezayen, H.; *J. Pharm. Anal.* **2013**, *3*, 132.
- Uslu, B.; Topal, B. D.; Ozkan, S. A.; *Talanta* **2008**, *74*, 1191.
- Trindade, M. A. G.; Silva, G. M.; Ferreira, V. S.; *Microchem. J.* **2005**, *81*, 209.
- Trindade, M. A. G.; Cunha, P. A. C.; Araújo, T. A.; Silva, G. M.; Ferreira, V. S.; *Eletica Quim.* **2006**, *31*, 31.
- Bilibio, U.; Oliveira, L. H.; Ferreira, V. S.; Trindade, M. A. G.; *Microchem. J.* **2014**, *116*, 47.
- Santos, A. L.; Takeuchi, R. M.; Stradiotto, N. R.; *Curr. Pharm. Anal.* **2009**, *5*, 69.
- El-Maali, N. A.; *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 99.
- Gupta, V. K.; Jain, R.; Radhapyari, K.; Jadon, N.; Agarwal, S.; *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 179.
- Garbellini, G. S.; Pedrosa, V. A.; Salazar-Banda, G. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 2025.
- Cobelo-García, A.; Santos-Echeandía, J.; López-Sánchez, D. E.; Alméjida, C.; Omanovi, D.; *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2308.
- Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 86.
- Raspor, B.; Pizeta, I.; Branica, M.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *285*, 103.
- Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanon, M. V. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 54.
- Wang, F.; Zhu, L.; Zhang, J. *Sens. Actuators, B* **2014**, *192*, 642.
- Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81.
- Hoyer, B.; Jensen, N.; *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 759.
- Hoyer, B.; Jensen, N.; *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 257.
- Hoyer, B.; Jensen, N.; *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 323.
- Hoyer, B.; Jensen, N.; *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *601*, 153.
- Jara-Ulloa, P.; Núñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1490.
- Hu, C.; Yang, C.; Hu, S.; *Electroanal. Chem.* **2007**, *9*, 128.
- Avranas, A.; Retter, U.; Malasidou, E.; *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248*, 347.
- Hosseinzadeha, R.; Sabzid, R. E.; Ghasemlub, K.; *Colloids Surf., B* **2009**, *68*, 213.
- Caramit, R. P.; Andrade, A. G. F.; Souza, J. B. G.; Araujo, T. A.; Viana, L. H.; Trindade, M. A. G.; Ferreira, V. S.; *Fuel* **2013**, *105*, 306.