

# 1 Introdução

As quinolonas representam uma classe de antimicrobianos sintéticos composta por fármacos estruturalmente semelhantes e altamente eficazes no tratamento de uma série de infecções, sobretudo de as de origem bacteriana.<sup>1-5</sup> O desenvolvimento das quinolonas teve início com a descoberta do ácido nalidíxico em 1962 por Leshner *et al.*<sup>6</sup>, que apresentou atividade apenas contra as enterobactérias. Como o ácido nalidíxico não alcançava a concentração adequada na maioria dos tecidos e órgãos, sua indicação passou a ser restrita ao tratamento de infecções urinárias simples<sup>7</sup>.

Nos anos 70, outras quinolonas como o ácido oxolínico e a cinoxacina, foram sintetizadas. Apesar de possuírem atividade antimicrobiana discretamente superior a do ácido nalidíxico, tais compostos não representaram um avanço terapêutico significativo. Porém, nesse mesmo período, a síntese do ácido pipemídico, com a inclusão do grupo piperazínico na posição 7 (ver Figura 1.1), representou um importante avanço no campo das quinolonas<sup>8,9</sup>. Importantes modificações realizadas na estrutura molecular do ácido pipemídico como a inclusão de um átomo de flúor na posição 6 levou as quinolonas a serem chamadas de fluoroquinolonas (FQs)<sup>10</sup>, o que mais tarde possibilitou a síntese da norfloxacin nos anos 80, o primeiro agente antimicrobiano pertencente a esse novo grupo<sup>5,11</sup>.

Existem basicamente duas estratégias principais descritas na literatura para a síntese do anel quinolônico. A primeira delas foi desenvolvida por químicos da Bayer AG, onde o anel quinolônico é formado pela ciclização de intermediários 3-aminoacrilatos-2-(2-halobenzoil) (Figura 1.2). A outra estratégia sintética é conhecida como ciclização de Gould-Jacobs, sendo baseada na ciclização térmica ou catalisada, em meio ácido de malonatos anilinoetilênicos<sup>12</sup>. Essas estratégias sintéticas permitem a introdução de diferentes substituintes nas posições C-2, C-5, C-6, C-7, C-8 e N-1 do anel quinolônico e a síntese de novos compostos dessa classe (Figura 1.1).<sup>9,13-16</sup>

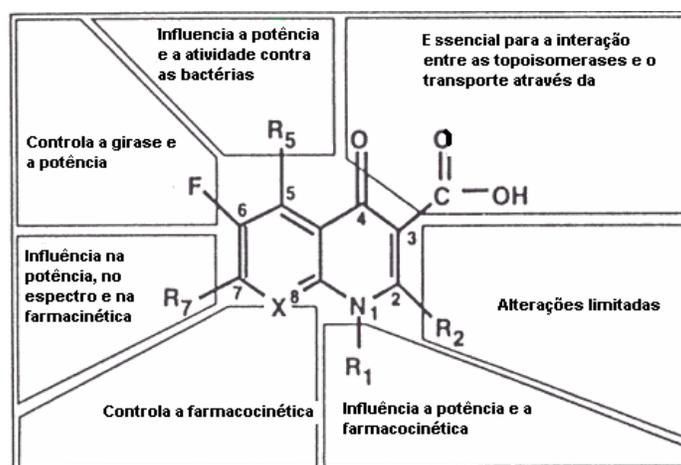


Figura 1.1 Relação entre a estrutura e a atividade das fluoroquinolonas (adaptado da ref. 20)

Estudos avaliando a relação entre a estrutura e as atividades desses compostos foram feitos por Peterson *et al.*<sup>17</sup>, onde, segundo o autor, as substituições nas posições 7 e 8 são extremamente importantes para aumentar a potência da atividade antimicrobiana. Desde então, numerosas modificações estruturais têm sido feitas no núcleo das quinolonas para aumentar sua atividade, melhorar o desempenho farmacocinético e farmacodinâmico além de melhorar a solubilidade e obter-se um prolongamento da meia vida no soro sanguíneo (Figura 1.1).<sup>18-20</sup>

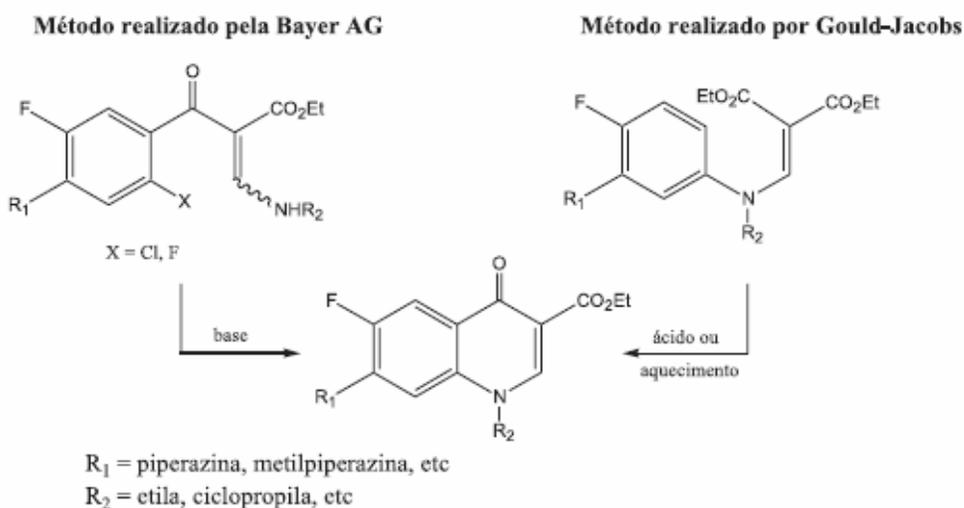


Figura 1.2. Duas das principais estratégias para construção do anel quinolônico (adaptado da ref. 12)

As FQs são intensamente usadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária.<sup>21-23</sup> Sua principal via de eliminação é feita pela urina, onde aproximadamente 70% das fluoroquinolonas excretadas permanecem de forma inalterada e cerca de 30% na forma de seus metabólitos.<sup>10</sup> As FQs são eficazes nas infecções do trato urinário, no tratamento da diarreia bacteriana, no tratamento de infecção dos tecidos moles, bem como em infecções intra-abdominais e das vias respiratórias, incluindo aquelas causadas por microorganismos resistentes a múltiplos fármacos<sup>24,25</sup>. Além de apresentarem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>1,4,15,26</sup> as fluoroquinolonas são medicamentos de fácil acesso para maioria da população. Na Figura 1.3, encontram-se as estruturas das FQs utilizadas nesse trabalho, duas delas (norfloxacina e ciprofloxacina) a serem selecionadas como analitos e as três restantes avaliadas como interferentes).

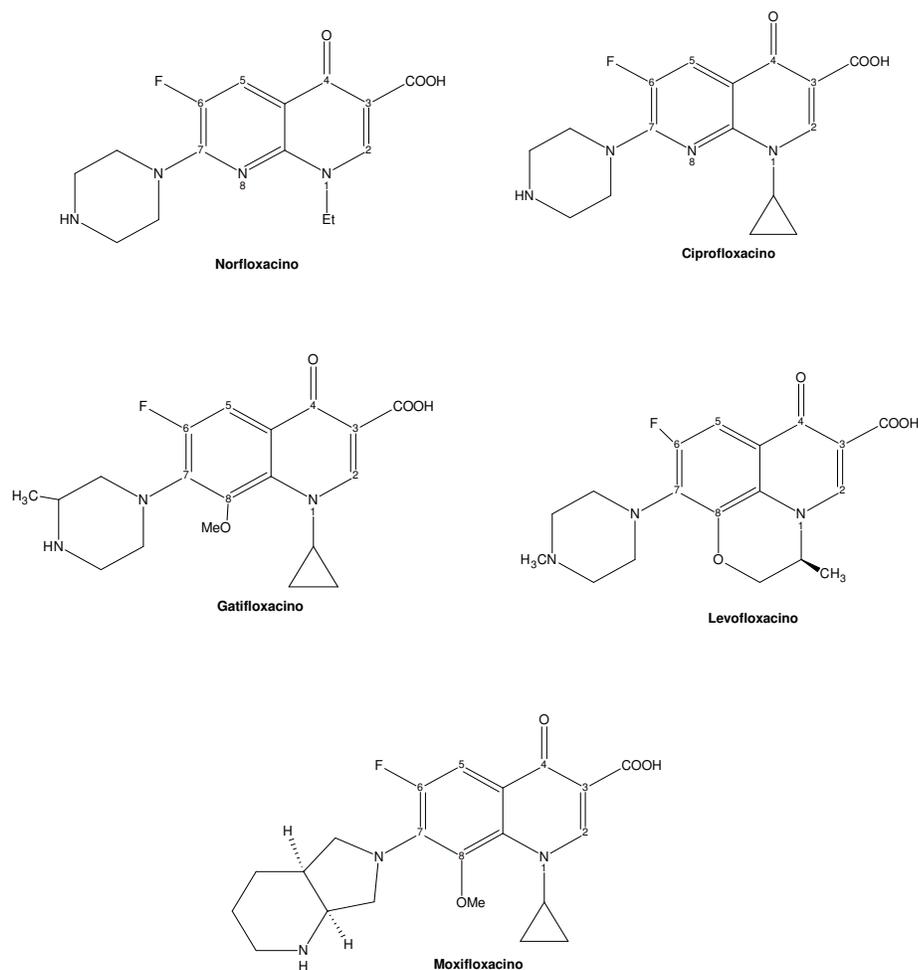


Figura 1.3. Estrutura das fluoroquinolonas estudadas

As quinolonas são atualmente uma das classes de agentes mais importantes no arsenal antimicrobiano, sendo utilizada no tratamento de mais de 800 milhões de pacientes. No início dos anos 70 suas indicações terapêuticas eram somente para o trato urinário e hoje seu uso é recomendado em diversas infecções em todo o corpo<sup>20</sup>. No entanto, as recentes modificações possibilitaram uma ótima combinação entre as propriedades e a potência das quinolonas, favorecendo suas propriedades e minimizando seus efeitos negativos.<sup>27</sup> Durante os últimos quinze anos esses antimicrobianos têm sido progressivamente reportados, passando de uma classe de compostos de pouca visibilidade para uma classe de compostos altamente importante e intensamente estudada.<sup>28</sup>

Esses agentes têm um mecanismo de ação similar, porém numerosos derivados tem sido sintetizados no esforço de realçar o espectro antimicrobiano e a atividade farmacológica além de minimizarem o risco de resistência das bactérias pela droga.<sup>28</sup>

## 1.1 Modo de ação

As FQs atuam na inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano, ambas são topoisomerases do DNA bacteriano e são essenciais para sua replicação. As enzimas são o DNA-girase e a topoisomerase IV<sup>20, 29-33</sup> cujas funções são romper a ligação entre as fitas da dupla hélice de DNA, posicionar no local da ruptura uma outra fita dupla e reparar depois esses locais simultaneamente.

A DNA-girase, por ser um tetrâmero (se divide em quatro partes iguais) é composta por duas subunidades denominadas GyrA e duas subunidades denominadas GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Esta enzima tem a função de introduzir superespirais negativas (processo que ocorre na direção oposta da fita helicoidal de DNA) na molécula do DNA bacteriano, além de desempenhar pelo menos quatro funções que são: manter o nível de espiralização, facilitar o movimento dos complexos de replicação e transcrição (removendo os superespirais positivos), remover os “nós” que se formam no DNA bacteriano e ajudar a curvar e dobrar o mesmo.<sup>20, 29</sup> Já a topoisomerase IV também é um tetrâmero composto por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. Tais genes são homólogos (substâncias que têm a mesma função, mas diferem pelo número de

átomos de carbono da cadeia principal) aos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Sua principal função é separar o DNA cromossômico replicado nas células-filhas respectivamente durante a divisão celular.<sup>20,29</sup>

As FQs interagem com o complexo formado entre a DNA-girase e o DNA bacteriano ou com um complexo formado entre a topoisomerase IV com o DNA bacteriano para criar modificações conformacionais que resultam na inibição de suas atividades enzimáticas. O novo complexo formado FQs-enzima-DNA bloqueia progressivamente a sua replicação, inibindo a síntese normal do DNA bacteriano, resultando na morte rápida da célula da bactéria (Figura 1.4).<sup>20,29</sup>

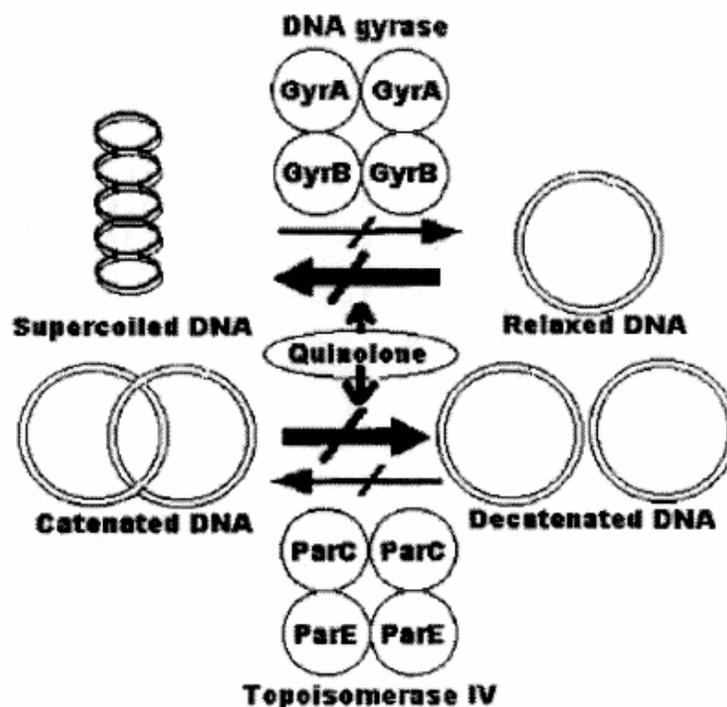


Figura 1.4. Mecanismo de ação das FQs (adaptado da referência 29)

Nos organismos Gram-negativos, a DNA-girase tende a ser o alvo preliminar das FQs, enquanto que nos organismos Gram-positivos o alvo preliminar tende a ser a topoisomerase IV. O mecanismo específico tem implicações importantes no desenvolvimento de resistências às FQs mais antigas e na eficácia das FQs de gerações mais novas.<sup>20</sup>

Conforme dito anteriormente, as FQs representam uma classe de antimicrobianos relativamente nova e muito eficaz tendo contribuído muito para o tratamento de infecções tanto hospitalares quanto comunitárias. Porém, o

desenvolvimento de resistência as FQs tem colocado em risco a utilização clínica desta classe de antimicrobianos<sup>34</sup>.

## 1.2 Mecanismo de resistência

A resistência às fluoroquinolonas ocorre através de dois mecanismos principais: (i) a alteração das enzimas-alvo da droga e (ii) alterações no acesso às enzimas-alvo da droga (Figura 1.5).<sup>20, 29</sup>

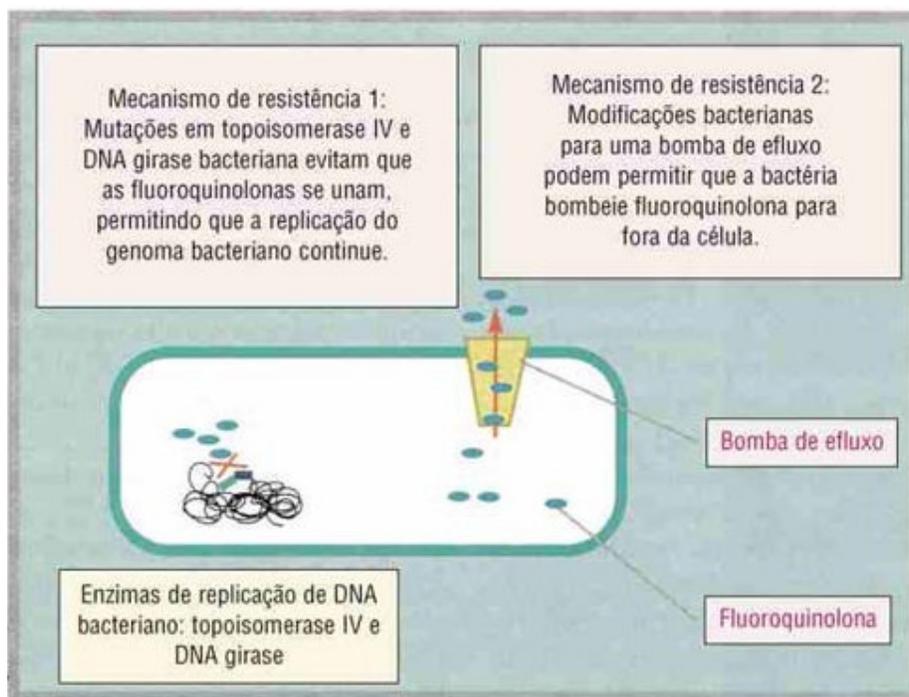


Figura 1.5. Mecanismo de resistência às fluoroquinolonas (adaptado da ref. 39)

As alterações nas enzimas-alvo da droga são sub-classificadas como mutações na DNA-girase e na topoisomerase IV, sendo que essas mutações são diferentes para cada tipo de bactéria. As alterações na DNA-girase ocorrem mais frequentemente em bactérias Gram-negativas e podem afetar as sub-unidades GyrA ou GyrB. As mutações nas sub-unidades GyrA tendem a ocorrer numa região conhecida como determinante de resistência às quinolonas (QRDR), que é o sítio receptor da droga. A QRDR é a região do gene *gyrA* que codifica a parcela da sub-unidade GyrA que é limitada ao DNA durante a atividade enzimática. As mutações mais comuns nesta região ocorrem devido à resistência adquirida à droga devido à diminuição da afinidade entre a droga e o

complexo alterado formado. Na GyrB as mutações ocorrem devido à aglomeração em um domínio análogo a QRDR, entretanto, é incerto se as mutações da nesta região da GyrB afetam a alteração da ligação da droga com o complexo. As mutações na GyrB tendem a resultar em níveis mais baixos de resistência quando comparadas com as mutações que ocorrem na GyrA.

As alterações na topoisomerase IV têm sido muito observadas em bactérias Gram-positivas, ocorrendo dentro de uma das duas sub-unidades ParC e ParE, sendo que a mutação em ParC ocorre com mais frequência que em ParE. Acredita-se que as mutações em ParC tenham um papel mais crítico no desenvolvimento de resistências. A sub-unidade ParC possui um domínio análogo ao QRDR sendo que a resistência à droga ocorre também por meio da redução da afinidade da droga com o complexo alterado formado.

Em geral, a resistência as FQs associadas às mutações nas topoisomerasas, ocorre de modo gradual e acumulativo, ou seja, mutações simples no sítio primário (QRDR) de ação da droga estão associadas aos moderados graus de resistência, enquanto mutações adicionais no sítio primário e/ou em outros sítios considerados secundários, levam a um alto grau de resistência<sup>35</sup>.

O outro mecanismo de resistência se baseia na alteração do acesso às enzimas alvos. Para alcançar seus sítios de ação no citoplasma bacteriano, as FQs atravessam a membrana externa pelas porinas e se difundem pela membrana citoplasmática.<sup>35,36</sup> A mutação nas porinas reduz a entrada das FQs no citoplasma bacteriano, o que diminui naturalmente a sua eficácia. Nas bactérias Gram-negativas o sistema de efluxo possui três componentes: uma bomba de efluxo localizada na membrana citoplasmática, uma proteína de membrana externa (porinas) e uma proteína de fusão da membrana. A proteína de fusão da membrana tem a função de ligar a bomba de efluxo à proteína de membrana externa (porinas). A resistência se dá através do bombeamento das fluoroquinolonas localizadas no citoplasma bacteriano para fora da célula.<sup>37-39</sup> Portanto, a resistência bacteriana é, e sempre será, um problema a ser considerado. Mesmo usando-se corretamente um antibiótico, a exposição faz com que as bactérias iniciem os mecanismos de resistência. No Brasil, esse problema assume dimensões ainda maiores pelo uso indiscriminado e incorreto dos antibióticos, pois os pacientes podem comprar livremente esses medicamentos sem a devida prescrição médica, usando-as em posologia errada ou por tempo não recomendado. Devido ao uso indiscriminado, algumas infecções virais são tratadas com antibacterianos, o que é mais um agravante.

Os antibióticos deveriam ser prescritos com extrema cautela e nunca usados em demasia ou de maneira descontrolada. A prescrição médica deveria ser obrigatória, com proibição de venda sem receita. As orientações de uso deveriam ser seguidas à risca, sem falha na frequência, dosagem recomendada e sem o prolongamento do uso orientado pelo médico. Os médicos, por sua vez, deveriam somente prescrever estes antimicrobianos na certeza de infecção bacteriana. A prescrição ideal seria baseada na identificação do microrganismo e de sua suscetibilidade.

Os antibióticos sintéticos são excelentes armas no controle das infecções e seu desenvolvimento tem sido um grande feito da humanidade. Seu uso inadequado pode gerar ausência de opções futuras de tratamento com falhas e frustrações inimagináveis. Falsificações de formulações tem sido outro problema comum no Brasil, principalmente com o advento dos medicamento genéricos que são produzidos por uma série de pequenos e médios laboratórios farmacêuticos brasileiros e estrangeiros. Um dos tipos de falsificação mais comuns se dá pela eliminação completa do princípio ativo do medicamento tornando a prescrição do mesmo completamente inútil. Outro procedimento de falsificação utilizado é a troca do princípio ativo de geração mais nova por um princípio ativo similar e mais barato por ser de uma geração mais antiga (menos potente, menor espectro de ação, tempo de meia vida no organismo menor e efeitos colaterais mais intensos).

### **1.3 Métodos analíticos para determinação de ciprofloxacina (CIP) e norfloxacina (NOR) em técnicas diversas**

Belal *et al.*<sup>28</sup> publicaram uma extensa revisão contendo 270 referências sobre os métodos analíticos para a determinação de quinolonas e FQs, inclusive norfloxacina (NOR) e ciprofloxacina (CIP), até o ano de 1999. Segundo o autor<sup>28</sup>, as determinações de CIP e de NOR são abordadas na Farmacopéia dos Estados Unidos da América (U.S.P.) sendo esses métodos oficiais baseados na cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por fotometria de absorção no UV-vis (HPLC-UV-vis), no caso da determinação da CIP, e por espectrofotometria de absorção no UV-vis ou por titulação potenciométrica no caso da determinação de NOR, ambos em preparações farmacêuticas. Dentre os métodos instrumentais relevantes descritos para a determinação da NOR e da CIP em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos ou amostras de alimento de origem animal se encontram a espectrofotometria de absorção no

UV-vis, espectrofluorimetria, HPLC-UV-vis e HPLC-Fluorimetria, aproveitando as características ópticas inerentes às duas substâncias. Além desses, a partir de 1999 são citados métodos baseados na quimioluminescência<sup>40</sup> da CIP e da NOR e nas técnicas de eletroforese capilar com detecção por fotometria de absorção no UV-vis.<sup>41-43</sup>

Devido o grande número e variedade de métodos, serão citados apenas alguns exemplos para cada técnica analítica, dando-se mais destaque aos que foram desenvolvidos a partir de 1999, e que por isso não se encontram citados no artigo de revisão de Belal *et al*<sup>28</sup>

Alguns métodos por espectrofotometria de absorção no UV-vis para NOR e para CIP se baseiam na absorvidade molar intrínseca das duas FQs. Por terem as moléculas de FQs grupos passíveis de reações ácido-base, os comprimentos de onda máximo escolhidos para as determinações espectrofotométricas dependem do pH do meio (em torno de 227 nm em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em torno de 283 nm em meio contendo HCl mais diluído, e em torno de 275 nm em meio contendo NaOH).<sup>44-46</sup> Outros métodos se baseiam na medição de absorvância na região do visível após a reação das FQs com íons (principalmente com Fe<sup>3+</sup> com máximo em torno 440 nm), complexos ternários com eosina e Pd<sup>3+</sup> (540 nm),<sup>47-51</sup> complexos de transferência de carga com diversos aceitadores de elétrons  $\pi$  (p-benzoquinona para CIP e NOR, p-nitrofenol para CIP e ácido pipemídico para NOR).<sup>52-55</sup> Três métodos mais recentes são descritos mais detalhadamente abaixo:

El-Brashy *et al*<sup>56</sup> determinaram NOR, CIP além de LEV em comprimidos usando espectrofotometria de absorção após reações de formação de par iônico e de transferência de carga. No método usando corante-ácido, soluções contendo LEV ou NOR foram transferidas separadamente para balões volumétricos contendo verde de bromocresol para formar complexos de transferência de carga. As soluções obtidas geraram absorbâncias máximas em 411 e 412 nm para a LEV e para a NOR, respectivamente. No segundo método, soluções de CIP foram misturadas em um funil de separação com solução tampão de acetato (pH 3) e solução de verde de bromocresol em solução de NaOH diluído. Após vigorosa agitação para formação do complexo de par-iônico entre CIP e verde de bromocresol, este foi extraído para fase orgânica (após adição de diclorometano). A absorbância máxima do complexo na fase orgânica foi de 412 nm. Os percentuais de recuperação obtidos neste método foram próximos de 100 % e os limites de detecção (LD) foram de 0,118; 0,094 e 0,096

$\mu\text{g mL}^{-1}$  para LEV, NOR e CIP respectivamente. A faixa de trabalho desse método foi de 1–20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os 3 compostos.

Em outro método, alíquotas de solução de NOR em acetonitrila foram transferidas para balões volumétricos contendo tetracianoetileno (TCNE). Após aquecidas a 60°C por 15 min, um complexo de transferência de carga (333 nm) foi obtido. O percentual de recuperação e o LD reportado para o método foram de  $99,88 \pm 0,45 \%$  e  $0,352 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente.<sup>56</sup> Pojanagaroon *et al*<sup>57</sup> utilizaram método de injeção de fluxo reverso para a determinação de NOR em comprimidos através da clássica reação entre o  $\text{Fe}^{3+}$  com o NOR em presença de sulfato de amônia em pH 3,5, resultando em um complexo amarelo com absorção em 435 nm. O LD obtido foi de  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

De acordo com os trabalhos acima, esses métodos são recomendados para o controle de qualidade e para análises rotineiras de formulações farmacêuticas (comprimidos), porém, as determinações foram feitas para cada composto isoladamente, não se aplicando em misturas de FQs.

A intensa fluorescência natural das quinolonas é decorrente de uma estrutura molecular relativamente rígida contendo um sistema de anéis conjugados ricos em elétrons  $\pi$ , onde se encontram alguns grupos substituintes que favorecem o aumento da eficiência quântica fluorescente (grupos carboxílicos, por exemplo). Como consequência, métodos analíticos baseados na fluorescência intrínseca de CIP e de NOR são facilmente encontrados na literatura. As características fluorescentes dessa classe de substâncias são bastante dependentes do pH do meio, o que explica a variação nos pares de comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ) reportados. Por exemplo, a determinação de NOR em formulações farmacêuticas (comprimidos) dissolvidas em HCl  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  foi feita medindo a fluorescência em 440 nm após excitação em 280 nm.<sup>58</sup> Já, em meio menos ácido (solução simulada de suco gástrico na presença de substâncias anti-ácidas), a determinação da NOR foi feita usando o par 330/445 nm.<sup>28</sup> Outras abordagens utilizam da complexação das FQs com íons de metais (por exemplo:  $\text{Sc}^{2+}$  - 280/480 nm,  $\text{Al}^{3+}$  - 320/440 nm, ou  $\text{Tb}^{3+}$  - 325/545 nm) no intuito de amplificar o sinal da fluorescência e/ou de obter deslocamentos nos  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ .<sup>59-61</sup> Outros artifícios podem ser usados como a medição de NOR indiretamente por atenuação de fluorescência do complexo NOR-ácido guanílico na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  ou medindo-se a fluorescência após formação de complexo de inclusão com beta-ciclodextrina. Em todos os casos, LDs reportados são da

ordem de sub- $\mu\text{g L}^{-1}$  <sup>62,63</sup>. Mais recentemente, Aly *et al.*<sup>40</sup> determinaram NOR e CIP além de ofloxacina em medicamentos e em fluídos biológicos (urina e plasma sanguíneo) por quimioluminescência. A quimioluminescência foi obtida com o uso do oxidante sulfato de cério (IV), o qual foi utilizado na oxidação do  $\text{Ru}(\text{bipy})_2^{3+}$  em  $\text{Ru}(\text{bipy})_2^{2+}$ , possibilitando a determinação das FQs. Um sistema de injeção em fluxo foi usado para facilitar a medição de sinal em intervalo de tempo igual para todas as amostras e padrões. Os valores de LD reportados para o método para a NOR e para a CIP  $3,1 \cdot 10^{-8}$  e  $2,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Com relação aos métodos eletroquímicos, a titulação potenciométrica com eletrodo conjugado de vidro (usando piridina como solvente e hidróxido de tetrabutilamônio como agente titulante no caso da CIP<sup>64</sup> e usando ácido acético glacial como solvente e ácido perclórico como titulante no caso da NOR<sup>65</sup>) é reportada sendo um dos métodos descritos como padrão para formulações contendo NOR<sup>65</sup>. Os diversos métodos voltamétricos e polarográficos reportados para as quinolonas e FQs se baseiam nas reações de oxiredução do grupo naftopiridínico em conjunto com o grupo carboxílico, sendo a principal vantagem dessas técnicas a potencial seletividade na determinação em fluidos biológicos. Dos trabalhos reportados mais recentemente, destaca-se o de Abulkibash *et al.*<sup>66</sup> que determinaram a CIP em comprimidos por titulação potenciométrica eletrolítica diferenciada. O trabalho se baseou na rápida reação de complexação entre o  $\text{Fe}^{3+}$  ( $0,097 \text{ mol L}^{-1}$ ) com o ciprofloxacino na razão 1:3, respectivamente, em ácido sulfúrico  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ , obtendo LD de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Outro trabalho, o de Ghoneim *et al.*<sup>67</sup>, foi desenvolvido para determinar a NOR na urina por voltametria adsorptiva usando pulso na forma de onda quadrada, carbono vítreo como eletrodo de trabalho e meio aquoso de pH 5, mantido com tampão acetato. O LD reportado foi de  $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a determinação de FQs, principalmente em matrizes complexas (fluidos biológicos e alimentos) ou em amostras contendo mistura de quinolonas, envolve o uso de HPLC com detecção de características ópticas inerentes dessas moléculas (fotometria de absorção ou fluorescência). Na Tabela 1.1, são resumidos as características dos métodos desenvolvidos para NOR e para a CIP a partir de 1999 (após a publicação do artigo de revisão de Belal *et al.*, onde tabela similar é reportada).

Tabela 1.1. Fluoroquinolonas e quinolonas determinadas por HPLC.

Analitos de interesse	Outros Analitos	Matriz	Coluna	Fase móvel	deteccção	Parâmetro de detecccção (LD ou LQ*)	Ref.
CIP NOR	enrofloxacina, difloxacina e marbofloxacina	Rim e músculo bovino e ovos	Hypersil C18, 5µm	0,1M ácido ortofosfórico, pH 3,5 – acetonitrila (85:15 v/v)	UV com arranjo de diodo, 190-350nm	CIP 1 ng mL <sup>-1</sup> NOR 2 ng mL <sup>-1</sup>	68
CIP	danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina, ácido nalidixílico, ácido oxolínico e sarafloxacina	Tecido muscular de galinha	PLRP-S, 5µm	Não mencionada	F comprimento de onda não reportado	2 µg kg <sup>-1</sup> ,	69
CIP	gatifloxacina, Ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e trovafloxacina	Plasma humano	HS C <sub>18</sub> , 5µL	10 mM SDS, 10 mM TBAA, 25mM ácido cítrico com 43% de acetonitrila, pH 3.5	F 280/450 nm	50 ng mL <sup>-1</sup> *	70
CIP	Enrofloxacina, sarafloxacina, ác. Oxolínico e flumequina	Porco e músculo de salmão	Water C <sub>18</sub> , 5µL e Supelco C <sub>18</sub> , 5µL	Acetonitrila/tampão de fosfato pH 3 (18:82 v/v) e Acetonitrila/tampão de fosfato pH 3 (34:66)	F 280/450 nm	5 ng g <sup>-1</sup>	71
CIP		Soro e urina	HS C <sub>18</sub> , 5µL	10 mM SDS, 10mM TBAA, 25 mM ác. Cítrico com 43% acetonitrila	UV - 280 nm e F - 293/450 nm	Soro UV=100 ng mL <sup>-1</sup> F=20 ng mL <sup>-1</sup> Urina UV=D=1µg mL <sup>-1</sup>	72
CIP		plasma	Purospher C <sub>18</sub> , 5µL	Acetonitrila/dihidrogênio fosfato de potássio (0,05 M; pH 3) 1:9 (v/v) com 10% acetonitrila	F 280/446 nm	Não mencionado	73
CIP NOR	Cinoxacina, ác. Oxolínico, ác. Nalidixílico, flumequina, enrofloxacina, enofloxacina, e danofloxacina	solo	Atlantis dC <sub>18</sub> , 3 µm	Variou de 96% A (ác. Fórmico 3, 16 mM, pH 2,5) e 4% B (acetonitrila) para 50% A e 50% B	UV 280 nm	NOR 0,06 µg g <sup>-1</sup> CIP 0,05 µg g <sup>-1</sup>	74

Valores reportados como limite de quantificação.

UV – detecccção por espectrofotometria de absorcccção no UV.

F - detecccção por espectrofotometria de fluorescência.

Métodos baseados em HPLC proporcionam ótimos LDs, porém, a seletividade na determinação é proveniente da separação prévia de componentes na coluna. Em HPLC, principalmente no caso da detecccção por fluorescência, se faz uso de material de consumo de custo elevado (solventes com alto grau de pureza, filtros para amostra, membranas para filtração de

solvente, pré-colunas e outros) o que eleva o custo das análises. Além disso, em muitos casos, as corridas cromatográficas duram vários minutos (por exemplo, 25 min para cada amostra analisada da referencia 73), o que torna a técnica com um elevado custo e aplicação demorada.

Mais recentemente, técnicas baseadas em eletroforese capilar (CE e congêneres) vêm sendo usadas como ferramentas analíticas para determinação da CIP e da NOR. Michalska *et al.*<sup>41</sup> determinaram CIP e suas impurezas em formulações farmacêuticas por eletroferese de zona capilar (CZE) usando como fase o tampão de fosfato com 1-pentano sulfonato de sódio (pH 6). CIP e 4 impurezas foram detectados por UV em 255, 272, 275 e 282 nm. Os LDs para CIP foram de 0,02 e 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  em 254 e 280 nm respectivamente.

Hernández *et al.*<sup>42</sup> determinaram a CIP além da enrofloxacin e flumequina em plasma de porco por eletroforese de zona capilar-capilar isotachoforese (CZE-ITP). Segundo os autores<sup>42</sup>, a CZE-ITP é uma técnica que permite aumentar a mobilidade da amostra e a sensibilidade quando comparada com CZE. As amostras foram tratadas por meio de extração em fase sólida e o LD para CIP foi 75  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os autores indicaram esta metodologia como alternativa à técnica de HPLC em análises residuais de quinolonas em amostras biológicas. Esse mesmo grupo de pesquisa<sup>42</sup> desenvolveu um método CZE para determinação de norfloxacin, lomefloxacin, enofloxacin, ácido pipemídico, ofloxacin, ácido piromídico, flumequina, ácido oxolínico, cinoxacin e o ácido nalidixílico também em plasma de porco. O melhor sistema de separação encontrado foi com um tampão de tetraborado de sódio contendo 10% (v/v) de metanol, com um pH 8,1. As soluções de amostra foram previamente limpas com cartucho C<sub>18</sub>. Os autores<sup>42</sup> obtiveram um percentual de recuperação de NOR adequado (entre 90 e 110%) e o LD reportado foi de 0,2 mg L<sup>-1</sup>.

Fierens *et al.*<sup>43</sup> determinaram norfloxacin, ciprofloxacin, ácido nalidixílico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, cinoxacin, ofloxacin, pefloxacin, fleroxacin e flumequina em formulações farmacêuticas por CE. A separação foi com tampão de acetato em pH 7 e a detecção fotométrica foi feita em 214 nm. Não foi possível nessas condições fazer a separação da CIP e da NOR.

Além dos métodos instrumentais citados, a literatura indica também métodos microbiológicos usando cultura de bactérias *E-coli*,<sup>75-78</sup> e cromatografia de camada fina usando detecção por fotometria de absorção (medida pela atenuação do feixe refletido no UV-vis) ou por fluorescência.<sup>79-81</sup>

## 1.4

### **Determinação de fluoroquinolonas por fosforimetria na temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP).**

Em contraste com os inúmeros métodos baseados em HPLC (com detecção por fotometria de absorção ou fluorescência), métodos de espectrofotometria de absorção e de fluorescência e métodos voltamétricos, o uso da fosforimetria tem sido praticamente ignorado como método de determinação de fluoroquinolonas, com exceção de apenas um trabalho. Li *et al*<sup>10</sup> realizaram um estudo das características fluorescentes e fosforescentes de sete quinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, além de pefloxacina, ácido pepemidico, ofloxacina, lomefloxacina e fleroxacin) utilizando substrato sólido (celulose), muito embora a vantagem do uso do substrato sólido seja mínima ou inexistente com relação a amplificação de sinal fluorescente. O uso do substrato só faz sentido quando se vislumbra o uso de cromatografia de camada fina em papel ou de separação de componentes por extração em fase sólida. Já no caso da fosforescência, o uso do substrato sólido, é quase sempre requisito para sua observação na temperatura ambiente, como veremos no próximo Capítulo.

As condições experimentais tais como o efeito de sais de átomo pesado e do pH da solução carreadora de analito foram estudados. O estudo de pH da solução depositada no substrato em fluorescência foi avaliado na faixa de pH entre 1 e 10, onde o melhor resultado de pH para todas as quinolonas foi com o pH 1,6. Para os estudos de pH em SSRTP a ofloxacina gerou maior intensidade espectral no pH 6,5 enquanto que as outras quinolonas geraram maior intensidade espectral com o pH 1,6. Nesse estudo foram testados mais de 30 sais de átomos pesados (sais de Th<sup>4+</sup> não foram usados) sendo o Cd(OAc)<sub>2</sub> o sal que gerou melhor intensidade fosforescente. Em termos de parâmetros de mérito, para SSRTP (na presença de quantidade ótima de Cd(OAc)<sub>2</sub>) as curvas analíticas obtidas tiveram coeficientes de correlação maiores que 0,99 e os limites de detecção absolutos (LDA) foram da ordem de subnanograma em muitos casos, para 5 µL de amostra depositada no substrato. Os autores indicaram que tanto o SSRTF quanto o SSRTP mostraram-se promissores para a determinação de cada uma dessas quinolonas (na ausência das outras) em urina humana<sup>10</sup>.

Os resultados obtidos por Li *et al*<sup>10</sup> com o uso do Cd(OAc)<sub>2</sub> mostraram-se promissores na determinação dessas sete quinolonas, porém, como as características fosforescentes dessas substâncias na presença de cádmio são

semelhantes, o uso desse indutor de fosforescência não é recomendado para o caso de determinações seletivas entre fluoroquinolonas.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso nitrato de tório (IV) como sal de átomo pesado indutor de fosforescência visando determinar seletivamente CIP e NOR. Para tal, foi feita uma cuidadosa comparação do efeito do sal de tório com os sais indutores tradicionalmente utilizados em SSRTP. O impacto do uso de artifícios adicionais tais como o ajuste de pH da solução carreadora do analito, presença de surfactantes modificadores de superfície, varredura espectral de modo sincronizado aliado à escolha de banda espectral de passagem foi estudado. Com a estratégia de análise bem definida, desenvolveu-se obter metodologias para determinação de CIP e de NOR em misturas contendo outras FQs e em uma matriz biológica complexa (urina) sem que seja necessária a prévia separação do analito de interesse das outras substâncias de estrutura molecular semelhante e de outros componentes da matriz em análise.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a capacidade de indução seletiva de fosforescência de cinco FQs usando: KI;  $\text{TINO}_3$ ;  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ;  $\text{HgCl}_2$ ;  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ .
- Estudar as características fosforescentes de cinco FQs: norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEV), ciprofloxacina (CIP), gatifloxacina (GAT) e moxifloxacina (MOX).
- Estudar o efeito do pH das soluções carreadoras nas características fosforescentes das FQs em substrato de celulose.

- Avaliar o desempenho do uso da varredura sincronizada para determinação seletiva de FQs.
- Estudar univariadamente o efeito da variação da quantidade de sal indutor de átomo, da quantidade do SDS e da concentração hidrogeniônica da solução carreadora na magnitude do sinal fosforescente dos analitos escolhidos.
- Estudar a interação entre fatores experimentais e otimizar as condições experimentais do método usando planejamento fatorial e análise do gráfico de Pareto.
- Comparar o desempenho analítico do método baseado no uso do tório com o baseado no uso do cádmio, já descrito na literatura.
- Obter e comparar parâmetros analíticos de mérito validando parcialmente as metodologias.
- Realizar um estudo de interferência na determinação de NOR e de CIP e estabelecer estratégias para determinação em amostras contendo concomitantes potencialmente interferentes.
- Avaliar o desempenho dos métodos de análise e formulações farmacêuticas e em urina.