

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais e reagentes

O padrão da levofloxacina (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), e a da norfloxacina (98% de pureza) foi adquirido na U.S.P. (EUA). O padrão da ciprofloxacina (98% de pureza) foi adquirido da Fluka (EUA). Os sais inorgânicos utilizados no preparo das soluções de átomos pesados foram de várias procedências. Nitrato de tálio (I) e acetato de cádmio dihidratado foram da Acros Organics (EUA); nitrato de prata, nitrato de chumbo (II) e cloreto de mercúrio (II) da Vetec (Brasil); iodeto de potássio da Merck (Brasil) e o nitrato de tório (IV) foi obtido pela RP ACS (Itália). O surfactante utilizado como modificador de superfície foi o dodecil sulfato de sódio (SDS) proveniente da Merck (Brasil). No preparo das soluções foi utilizada acetona P.A. da Merck (Brasil) e água ultrapurificada obtida do Ultra Purificador de água Master System 1000 – GEHAKA.

Para ajuste de pH das soluções utilizou-se o tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹, cujo preparo foi obtido com a mistura do ácido orto-fosfórico, ácido acético glacial ambos da Merck (Brasil) e o ácido bórico da Reagen Quimibrás (Brasil). A adição posteriormente de hidróxido de sódio (Merck) possibilitou a obtenção de soluções-tampões de pH compreendidos na faixa de $2 \pm 0,02$ à $12 \pm 0,02$.

Para os testes de recuperação e interferência, utilizou-se os medicamentos genéricos levofloxacino (250 mg) fabricado pela Ranbaxy Laboratories Limited e cloridrato de ciprofloxacino (250 mg) produzido pela SEM industria Farmacêutica Ltda, floxacina^{MR} (norfloxacino 400 mg) produzido pela Merck Sharp & Dohme farmacêutica Ltda.

O nitrogênio comercial (99,96 %) utilizado para purgar o interior do espectrômetro de luminescência foi adquirido na AGA (Brasil). Um sistema para desoxigenação (Figura 3.1), consistiu em duas soluções em linha, cuja composição era metavanadato de amônio (Química Moura, Brasil), ácido clorídrico P.A. (Merck, Brasil), zinco em pó na (Vetec, Brasil) e mercúrio metálico

(F. Maia, Brasil). A secagem do nitrogênio (Figura 3.1) foi feita após a passagem nas soluções desoxigenantes, forçando o fluxo de nitrogênio contra a gravidade em duas colunas de sílica (Vetec, Brasil).

Uma micropipeta regulável de 1 a 10 μL da Wheaton Socorex (Suíça) foi utilizada para a aplicação das soluções de amostras e das soluções padrões, de sais de átomos pesados e de surfactante no substrato de celulose. Para o preparo de soluções foi utilizada micropipeta regulável de 100 a 1000 μL da Brand (EUA). O substrato sólido utilizado como matriz para indução de fosforescência foi o papel Whatman 42 da Whatman Ltd (Inglaterra).



Figura 3.1. Sistema de desoxigenação e secagem do nitrogênio.

3.2 Instrumentação

3.2.1 Espectrômetro de luminescência

Os espectros de excitação e emissão fosforescentes foram obtidos em um espectrofotômetro de luminescência comercial da Perkin Elmer modelo LS 55 (Perkin Elmer, EUA) mostrado na Figura 3.2.



Figura 3.2. Espectrômetro de luminescência Perkin-Elmer – modelo LS 55.

O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com $8\mu\text{s}$ de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5 sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm. O sistema de detecção possibilita o ajuste temporal de aquisição de sinal (Tempos de retardo de abertura de detecção entre 0 a 800 μs). Monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão.

Um esquema simplificado do sistema óptico do equipamento é mostrado na Figura 3.3.

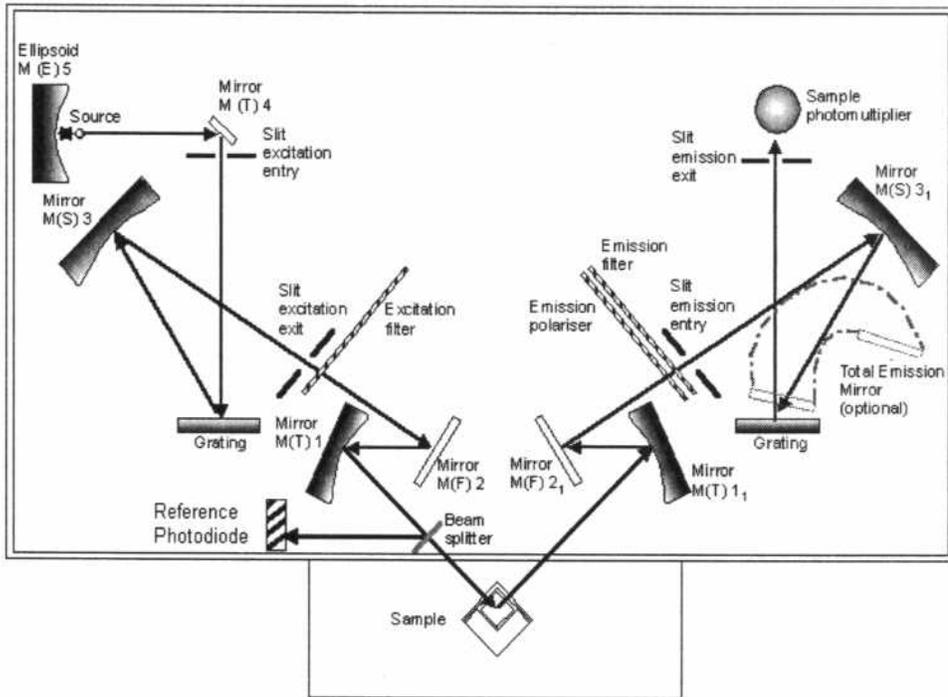


Figura 3.3. Esquema óptico do espectrômetro de luminescência Perkin Elmer – LS 55.

Entre os vários acessórios que o equipamento possui, para realizar as medições de fosforescência, foi utilizado o aparato de medição em superfície sólida que é acoplado no compartimento de amostra do espectrofotômetro de luminescência como é mostrado na Figura 3.4.



Figura 3.4. Aparato de medição em superfície sólida.

3.2.2 Reator fotoquímico

Um reator fotoquímico, cuja foto é mostrada na Figura 3.5, foi construído aproveitando-se uma carcaça de estufa. Na parte interna dessa carcaça, instalou-se um conjunto de seis lâmpadas de vapor de mercúrio de 6W (lâmpadas de esterilização) cuja emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) é em torno de 300 nm. Esse reator foi utilizado para a irradiação dos substratos de celulose (papéis Whatman 42 cortados na forma de círculos de 18 mm de diâmetro) como mostrado no detalhe da Figura 3.5.

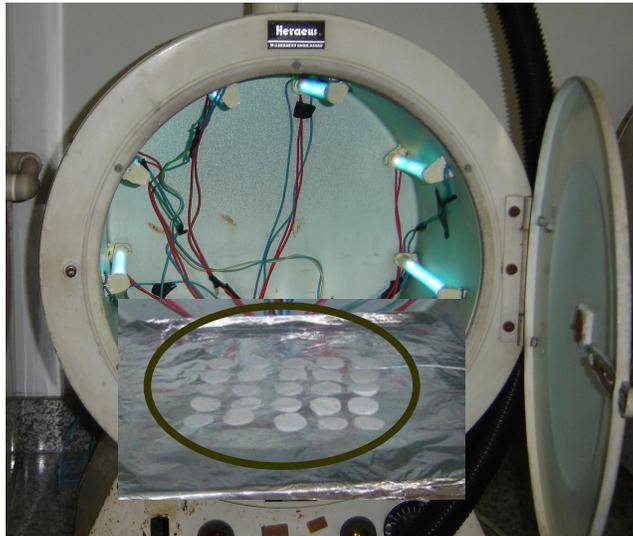


Figura 3.5. Reator fotoquímico.

3.2.3 Sistema de lavagem e secagem dos papéis

Para tratamento dos papéis utilizados como substrato sólido foi necessário lavar as folhas de papel filtro com água quente em refluxo em extratores Soxhlet seguido de secagem dos mesmos com uma lâmpada de luz infra-vermelha de 150 W (Phillips, Brasil) como é mostrado na Figura 3.6a e 3.6b.

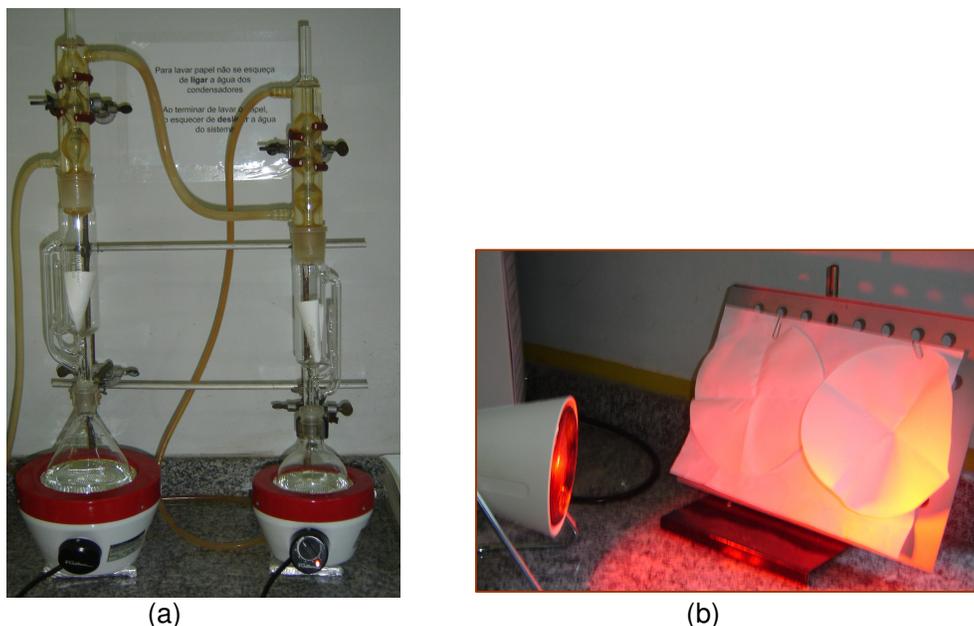


Figura 3.6. (a) Sistema de lavagem (Soxhlet) e (b) secagem do substrato.

3.2.4 Outros equipamentos auxiliares

Para a secagem dos substratos de celulose após deposição de amostras ou brancos, um dessecador a vácuo foi usado. O vácuo foi produzido por uma bomba da Fisatom (Brasil), modelo 820 de 300 W. Para as medições de pH das soluções e para o preparo dos tampões Britton-Robinson, foi utilizado um medidor de pH da Tecnocon (Brasil). Uma *Centrífuga Baby I* – modelo 206BL (FANEM, Brasil) foi utilizada no preparo de amostras de urina. Todas as massas necessárias para o preparo das soluções foram pesadas em balança analítica (0,1 mg – modelo AM-220), fornecida pela Marte (Brasil). Para a melhor dissolução de alguns solutos foi necessário o uso de um banho ultrassônico, modelo USB124 e potência 50 W, fornecido pela CTA do Brasil (Brasil).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Procedimentos gerais

A limpeza do material utilizado em todos os experimentos foi feita primeiramente com detergente neutro e posteriormente enxaguada abundantemente com água. O material então foi imerso em ácido nítrico 10% v/v por um período de 24 horas. Posteriormente, o material foi retirado do ácido e lavado abundantemente com água destilada e depois imerso em água ultrapurificada por aproximadamente 2 horas.

Para os estudos iniciais das características fosforescentes das fluoroquinolonas, soluções estoque de concentração de 10^{-3} mol L⁻¹ foram preparadas em acetona/água 50/50% v/v e a partir das diluições dessas com água, obteve-se soluções na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹ com composição final de sistema de acetona/água 5/95%, v/v. Deve-se ressaltar que todas as soluções dos compostos estudados foram preparadas imediatamente antes da análise. Para os testes iniciais foram realizadas medições fosforescentes dos compostos em acetona/água, acetona/NaOH (0,25 mol L⁻¹) e acetona/HNO₃ (0,25 mol L⁻¹).

Soluções estoque de AgNO₃ 1,0 mol L⁻¹, TlNO₃ 0,25 mol L⁻¹, Pb(NO₃)₂ 0,25 mol L⁻¹, HgCl₂ 0,20 mol L⁻¹, KI 1,0 mol L⁻¹, CdC₄H₆O₄.2H₂O (também representado aqui como Cd(OAC)₂) 0,50 mol L⁻¹, Th(NO₃)₄.4.H₂O 0,50 mol L⁻¹ e SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) 0,25 mol L⁻¹ foram feitas em balões volumétricos utilizando água ultra purificada. Quando necessário, soluções de diferentes concentrações eram preparadas a partir destas.

Para garantir que o pH não variasse ao longo da diluição nas soluções contendo o analito, inicialmente optou-se em adicionar 30% em volume de tampão em substituição por igual parte de água do sistema. Após a escolha do melhor pH para cada analito, fez-se um ajuste de melhor volume de tampão nas soluções

Na construção das curvas analíticas para a norfloxacin, levofloxacin e ciprofloxacina foram preparados padrões cujas concentrações variaram de $1,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, utilizando as condições otimizadas para cada analito. Para a NOR com o uso do nitrato de tório e do acetato de cádmio, as soluções carreadoras foram preparadas em pH 12 e 9 respectivamente e fazendo a

medição em substratos tratados com 5 μL de soluções de concentrações de nitrato de tório $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (480 μg) e de acetato de cádmio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (666 μg), respectivamente. As massas de SDS nos substratos foram de 290 e 360 μg respectivamente para as condições com acetato de cádmio e com nitrato de tório. Apesar de terem sido realizadas todas as verificações das melhores condições para a LEV, optou-se em utilizar as condições otimizadas para a NOR visando a determinação seqüencial de NOR e de LEV. As condições otimizadas para o CIP com o uso do nitrato de tório e do acetato de cádmio foram obtidas com o pH 5,8 e 10, e usando substratos contendo 5 μL de solução de concentração $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de tório ou 5 μL de solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de cádmio respectivamente. Massas de SDS de 360 μg (usando nitrato de tório) e 216 μg (usando nitrato de cádmio) foram utilizadas nos substratos.

Na determinação dos analitos em urina, em todos os casos não foi necessário um pré-tratamento. As interferências da matriz foram contornadas apenas com uma diluição de dez vezes da mesma.

Nas análises de interferência, foram preparadas soluções com diferentes razões molares entre interferente e analito e os sinais fosforescentes obtidos foram comparados com aqueles obtidos nas soluções padrões de referência do analito.

As soluções dos medicamentos foram preparadas com base na quantidade informada de cada princípio ativo contida na bula. Inicialmente, foram preparadas soluções medicamentosas de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, posteriormente, retirou-se alíquotas de 0,5 mL, para que cada solução medicamentosa ficasse com sua concentração final de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.2

Procedimento de preparação de substrato de celulose de baixo sinal de fundo

Para reduzir o sinal de fundo dos substratos de celulose, os substratos sólidos foram lavados com água destilada em extrator Soxhlet por um período mínimo de duas horas, após lavagem o papel foi seco sob exposição à lâmpada de infra-vermelho por aproximadamente 30 minutos. Em seguida o papel foi cortado em círculos de 18 mm de diâmetros e foram expostos à radiação ultravioleta em um reator fotoquímico (Figura 3.5) por aproximadamente duas horas.

3.3.3 Procedimento geral para medições fosforescentes

Na medição fosforescente utilizou-se 5 μL (em uma única ou em múltiplas adições) de cada uma das soluções que foi adicionada na seguinte ordem: solução de SDS (quando necessário), solução do sal do metal pesado e solução da amostra, padrão ou do branco (Figura 3.7). A deposição dessas soluções no substrato sólido foi feita após o papel de filtro ter sido cortado e a deposição das soluções foi realizada com o auxílio de uma micropipeta. Procurou-se ao máximo adicionar as soluções no centro do substrato sólido com o objetivo de minimizar os desvios padrões.

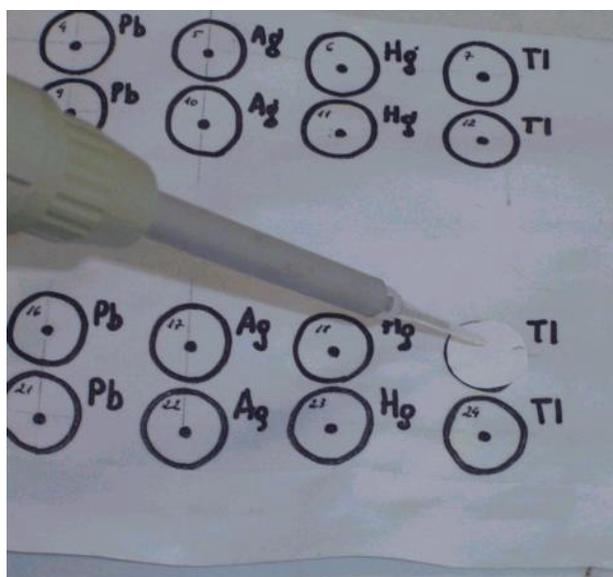


Figura 3.7. Aplicação das soluções no substrato sólido com o auxílio de um template e com uso de uma micropipeta.

Após esse procedimento os substratos sólidos foram colocados para secar sob vácuo em um dessecador protegido da luz (Figura 3.8) por aproximadamente duas horas.

No momento das medições cada substrato foi colocado em um suporte para leituras de substratos sólidos (Figura 3.9), o qual foi acoplado ao aparato de medições em superfícies sólidas. Feito isso, o substrato foi purgado com nitrogênio (seco e desoxigenado) por um período de aproximadamente 3 minutos. Em seguida, foram realizadas as medições fosforescentes. É

importante salientar que este procedimento foi usado para cada uma das amostras de substrato sólido.



Figura 3.8. Dessecador sob efeito do vácuo e protegido da luz.

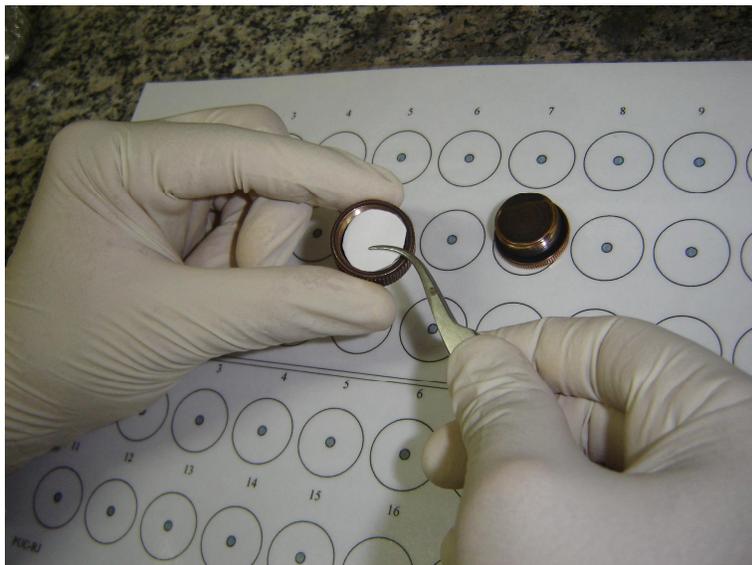


Figura 3.9. Colocação do substrato de papel no suporte.