

1 Introdução

1.1. Picoxistrobina e Piraclosbrobina

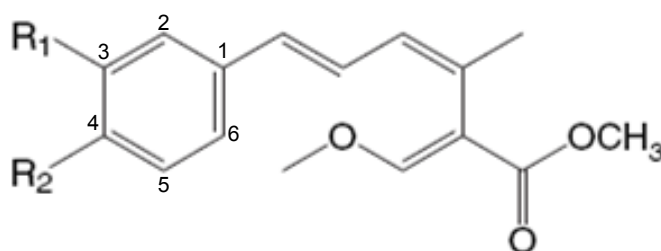
Uma questão recorrente e atual se refere à capacidade dos nossos recursos naturais em sustentar a crescente população humana. No caso da produção de alimentos, o aumento de eficiência passa pela maior produtividade por área plantada e pelo controle de pragas. O uso de cultivares geneticamente modificado e resistente às pragas é ainda controverso e a aceitação dos alimentos transgênicos por parte de população corre o risco de ser limitado por causa da falta de estudos que apontem a ausência de efeitos colaterais decorrentes de seu consumo. A utilização de pesticidas é ainda a estratégia mais difundida para o controle de pragas, sendo essa prática extensiva depois da II Guerra Mundial por causa da introdução do DDT, BHC, aldrina, dietilaldrina, endrina e 2,4-D. O baixo custo e a eficácia dessas substâncias químicas as fizeram muito populares entre os agricultores. Iludidos por uma falsa sensação de segurança, aplicava-se liberadamente esses pesticidas para se obter ambientes livres de pragas. Esse uso indiscriminado teve como consequência o aparecimento de pragas resistentes aos pesticidas, contaminação de várias plantas e animais, intoxicação de trabalhadores rurais e consumidores e o aparecimento de resíduos de pesticidas em lugares inesperados tais como rios, reservatórios de água e poços domésticos¹. Esse fato resultou em uma reorientação da estratégia de controle de pragas para a obtenção e uso de pesticidas mais específicos e alternativamente, de métodos de cultivo que prescindam do uso dos pesticidas, como exemplo, o uso de feromônios e integração de pestes controle. No entanto, infelizmente, essas estratégias alternativas ainda não suplantam a necessidade de novas formulações de pesticidas para melhorar a produção na agricultura².

As formulações usadas na produção de pesticidas são desenvolvidas com propriedades específicas que são dependentes das estruturas químicas e características físicas dos constituintes. Conseqüentemente, diferentes classes de pesticidas podem ser usadas em combinação e, talvez, em diferentes

momentos do cultivo para aumentar o efeito desejado³. Mesmo assim, ainda que usados corretamente, acidentes decorrentes do uso de pesticidas são comuns. Muitas outras classes de pesticidas podem prejudicar o meio ambiente e provocar intoxicações graves nos seres vivos¹.

Os mais novos pesticidas introduzidos no mercado têm como característica não terem elevada persistência no meio ambiente, mas por causa do grande consumo em plantações o monitoramento destes em alimentos e em bebidas é de especial importância². Muitas dessas novas formulações são fabricadas a partir de pesticidas naturais, como por exemplo, as estrobilinas sintéticas, que foram produzidas a partir de estrobilurinas naturais, sendo estes compostos mais facilmente degradados em plantas, animais e água^{1,4}.

Os pesticidas (fungicidas) da classe das estrobilurinas são substâncias naturais isoladas principalmente de cogumelos (basidiomicetes). Seu nome é derivado dos cogumelos do gênero *Strobilurus*. Estrobilurina-A foi o primeiro pesticida dessa classe e que foi isolado a partir de culturas de líquidos de *Strobilurus tenacellus* por Anke *et al*^{5,6}. A partir desse estudo, muitos outros compostos naturais estrobilurinas foram isolados e identificados, sendo os mesmos nomeados em ordem de suas descobertas: estrobilurina-A, estrobilurina-B, estrobilurina-C, estrobilurina-D, etc⁷. Todas as estrobilurinas naturais possuem a estrutura do acrilato (E)-3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienil), sendo que a diferença entre cada uma delas é decorrente dos tipos de substituintes do anel aromático nas posições 3 e 4. A Figura 1 mostra a estrutura e dois possíveis substituintes do anel (estrobilurina-A e estrobilurina-B).



Estrobilurina A: $R_1 = H$; $R_2 = H$

Estrobilurina B: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = Cl$

Figura 1: Estrutura dos pesticidas estrobilurinas naturais (adaptado ref.⁸).

As estrobilurinas naturais foram os compostos de partida para produção de estrobilurinas sintéticas que são mais estáveis e mais potentes quando usados comercialmente na agricultura para controle de fungos. Pode-se dizer que as estrobilurinas sintéticas são compostos relativamente novos, pois o primeiro foi registrado somente em 1997, e até o momento, apenas oito estrobilurinas foram sintetizados de forma eficiente para uso comercial (azoxistrobina, kresoxim-metil, trifloxistrobina, metominostrobin, fluoxastrobina, piraclostrobina, picoxistrobina e dimoxistrobina). O primeiro da classe a ser sintetizado e registrado foi a azoxistrobina e o mais recente é a dimoxistrobina. A síntese desses pesticidas foi realizada focando principalmente substituições na estrutura (E)- β -metoxiacrilato⁷.

Nessa dissertação de mestrado, um método analítico foi desenvolvido para determinar duas dessas estrobilurinas, a picoxistrobina e a piraclostrobina. A piraclostrobina foi descoberta por cientistas da BASF em 2000 e registrada no mesmo ano. Sua estrutura é caracterizada como um derivado do carbamato com o grupo toxicóforo, sendo sua fórmula molecular $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$ e massa molar igual a $387,8 \text{ g mol}^{-1}$. Esse composto apresenta solubilidade em água igual a $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ (a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), solubilidade em solventes orgânicos que varia de $3,7$ (n-heptano) a 500 (acetona) g L^{-1} e possui valores de log P, em pH 7,0 igual a $3,99$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A descoberta da picoxistrobina foi anunciada pela agroquímica Zeneca (agora Syngenta-AGC) em 2000 e registrado em 2001. Esse composto possui fórmula molecular $C_{18}H_{16}F_3NO_4$ e massa molar igual a $367,2 \text{ g mol}^{-1}$. A solubilidade em água é igual $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ (a 20°C), sua solubilidade em solventes orgânicos, a 20°C , varia de $9,6$ (metanol) a 250 g L^{-1} (xilol) e possui log P em pH 7,0 igual a $3,60$ a 20°C . Na Figura 2 são mostradas as fórmulas estruturais desses dois pesticidas e seus respectivos nomes segundo IUPAC.

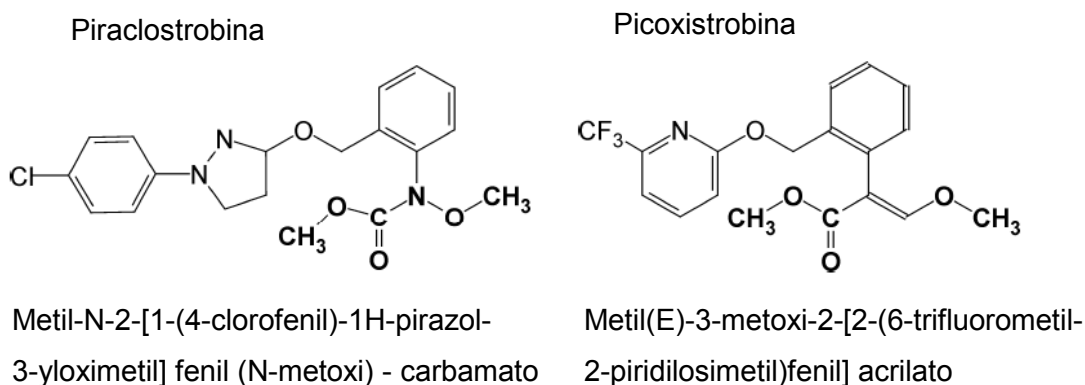


Figura 2: Estrutura das duas estrobilurinas (adaptado ref 8).

1.2. Modo de ação e toxicidade

As estrobilurinas inibem a respiração celular ligando-se a um local específico nas mitocôndrias, o local de oxidação do quinol (ou do ubiquinol) do citocromo b, e desse modo a transferência de elétrons entre o citocromo b e c cessa, o que leva a diminuição da taxa de oxidação do NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e síntese do ATP (adenosina trifosfato). Como consequência, a produção de energia é parada e o parasito (fungo) morre. Esse modo de ação é diferenciado e tem alvo específico, sendo diferente da inibição do citocromo c, o qual é o mecanismo conhecido de asfixia do cianato e do monóxido de carbono. As estrobilurinas são mais conhecidas como fungicidas inibidores quinonas (Q_oI), cuja característica importante é a ação rápida e concentrado no primeiro período do ciclo de vida dos fungos, isto é, no estágio de esporos. Por causa desse modo de ação diferenciado, as estrobilurinas são degradadas rapidamente nas plantas e nos compartimentos do meio ambiente (água, solo). A aplicação das estrobilurinas produz nas plantas uma cor verde mais saudável (“efeito verde”) e gera um aumento significativo no volume e na qualidade da colheita. A maioria dos fungicidas estrobilurinas tem um período residual de aproximadamente 21 dias⁷.

Todos os pesticidas estrobilurinas comerciais têm amplo espectro de atividade antifúngica, sendo eficazes contra todos os grandes grupos de fungos patogênicos em plantas (Oomicetes, Deuteromicetes, Ascomicetes e Basidiomicetes). A picoxistrobina pode ser usada em lavouras de trigo, centeio, cevada e aveia. Já a piraclostrobina pode ser aplicada em lavouras de soja, uva, batata, tomate, banana, citros e amendoim^{7,8}.

Os pesticidas estrobilurinas são considerados como uma família de pesticidas relativamente seguros em termos de efeitos agudo, crônico e em longo prazo. As quantidades esperadas para causar toxicidade aguda em indivíduos de 68 kg seriam as seguintes: de 500 até 5.000 mg/kg (ingestão oral), de 2.000 a 20.000 mg/kg (exposição cutânea) e de 2.0 a 20.0 mg/L (inalação). Até o ano de 2005 não havia relatos de efeitos teratogênicos e carcinogênicos decorrentes da exposição às estrobilurinas. As estrobilurinas são tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos, por isso, a aplicação em torno de poços d'água devem ser acompanhadas de cuidados que são indicados nas embalagens dos produtos⁹. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,043 mg kg⁻¹ para a picoxistrobina e 0,040 mg kg⁻¹ para a piraclostrobina¹⁰.

1.3.

Métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina

Métodos analíticos têm sido reportados para a determinação simultânea de fungicidas inibidores Q_oI, grupo na qual as estrobilurinas são uma classe relativamente nova. As técnicas analíticas cromatográficas são as mais utilizadas nas análises de amostras (frutas, vegetais, sucos, vinhos e compartimentos ambientais). Os exemplos mais relevantes são indicados abaixo.

Um dos métodos proposto por Abreu *et al.*¹¹ possibilitou a determinação de azoxistrobina, kresoxim-metil e trifloxistrobin em uva e em vinho por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção espectrofotométrica em sistema de arranjo de diodos (HPLC-DAD). As estrobilurinas foram detectadas em 207 nm. As amostras passaram por um processo de extração líquido-líquido e *clean-up* (remoção de interferentes) em cartuchos de sílica. O tempo de corrida do método foi de 13 min (modo isocrático usando metanol: água 80: 20% v/v) e a fase estacionária de RP-18. O limite de quantificação (LQ) em uvas e vinhos variou ente 0,219 mg kg⁻¹ para azoxistrobina e 0,523 mg kg⁻¹ para kresoxim-metil. Em outro trabalho, Abreu *et al.*¹² validaram o método HPLC-DAD para determinar os pesticidas citados acima além da piraclostrobina, e outros fungicidas como o famoxadone, e fenamidone. O método foi aplicado nas mesmas amostras citadas anteriormente. As amostras passaram por extração líquido-líquido com mistura de acetato de etila: hexano 50:50% v/v. O limite de quantificação (LQ) foi de 0,6 e 0,8 mg kg⁻¹ para as amostras de uva e vinho respectivamente. Os métodos desenvolvidos por Abreu *et al.*^{11,12} foram validados com análises feitas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa GC-MS.

Taylor *et al.*³ desenvolveram um método para análise de resíduos de 38 pesticidas (incluindo azoxistrobina, kresomi-metil e trifloxistrobina) em amostras de extrato bruto de frutas e de vegetais usando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em duas dimensões (LC-MS-MS), eluição em modo isocrático e fase estacionária de C-18. O método foi desenvolvido sem nenhum processo de *clean-up* dos extratos das amostras de uva, kiwi, morango, espinafre, limão, pêssego e nectarina. Para as análises

foram feitas fortificações nas amostras em níveis de 0,01 e 0,8 mg kg⁻¹. Para estrobilurinas, os maiores valores de recuperação obtidos entre as diversas amostras analisadas foram de 83% para a azoxistrobina em maçã, 87% para o kresoxim-metil e 76% para a trifloxistrobina em amostra de kiwi. Outro método que utilizou LC-MS-MS foi desenvolvido por Sannino *et al.*¹³ para determinação de 24 pesticidas, sendo três estrobilurinas (azoxistrobina, trifloxistrobina e kresxim-metil) que foram determinados em amostras de maçã, suco de limão concentrado e tomate. Os pesticidas foram separados em uma coluna polar de fase reversa e eluídos com gradiente. Os estudos foram realizados com fortificação das amostras em níveis entre 0,001 – 0,020 e 0,010 – 0,200 mg kg⁻¹, e recuperações foram obtidas na faixa entre 76 e 106%. Christensen *et al.*¹⁴ também validou um método para determinação desses mesmas estrobilurinas em amostras de trigo, maçã e uva. O método foi baseado em extração com acetato de etila: ciclohexano e remoção das impurezas por permeação cromatográfica em gel (GPC) seguido por determinação por GC com detecção por captura de elétrons (EC), nitrogênio/fosforo (NP) e espectrometria de massa (MS).

Na literatura podemos encontrar alguns trabalhos analíticos voltados para as estrobilurinas que usam as técnicas baseadas na eletroforese capilar (CE) em seus vários modos de operação, como por exemplo, a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC). Em alguns casos se identifica o uso de pré-concentração dos analitos em linha pelo modo de empilhamento normal. Os autores usam essa estratégia para melhorar a baixa sensibilidade da técnica de detecção fotométrica (detecção em torno de 200 nm). Juan-García *et al.*¹⁵, por exemplo, comparou dois processos de empilhamento para melhorar a sensibilidade de um método MECC para a quantificação de um grupo de pesticidas (fludioxonila, procimidone, piriproxifena, dinoseb e carbendazima) extraídos de amostras de uvas e alface. Hernández-Borges *et al.*^{16,17} também testaram várias técnicas de pré-concentração de pesticidas extraídos de sucos de frutas e leite de soja usando a técnica de CE. Ravelo-Pérez *et al.*^{2,18,19}, mais recentemente, usaram a MECC e o modo de empilhamento com polaridade reversa do eletrodo (REPSM) para a pré-concentração de pesticidas em extratos de amostras de vinhos^{2,18} e tomates¹⁹ (onde apenas a azoxistrobina da família das estrobilurinas estava presente). Em outro trabalho para determinar 11 pesticidas em amostras de água (apenas azoxistrobina estava presente) a técnica MECC também foi utilizada, com a realização de testes com os modos pré-concentração NSM e REPSM, sendo o modo REPSM o que apresentou

maior sensibilidade. Em todos os trabalhos citados os autores afirmaram ter conseguido aumentar a sensibilidade do método consideravelmente quando utilizaram os modos de pré-concentração por empilhamento da amostra. A azoxistrobina é a única estrobilurina analisada até o momento utilizando a técnica MECC^{2,18,19}. Os valores de LQ típicos para a azoxistrobina utilizando MECC-REPSM foi de 112 µg L⁻¹. Para a determinação da picoxistrobina nenhum método analítico foi desenvolvido até o momento.

1.4. Enrofloxacin

As quinolonas representam um importante grupo de antibióticos sintéticos com ação antibacteriana. O desenvolvimento das quinolonas teve início com a descoberta do ácido nalidíxico em 1962 por Lesher et al²⁰, que apresentou atividade apenas contra enterobactérias. Nos anos 70, outras quinolonas como o ácido oxolínico, o ácido pipemídico e a cinoxacina, foram sintetizadas. A inclusão de um átomo de flúor na estrutura do ácido pipemídico levou as quinolonas a serem chamadas de fluoroquinolonas (FQs) e a apresentarem importante propriedade antibactericida. Estudos avaliando a relação entre a estrutura e as atividades das FQs foram feitas por Perterson et al²¹, onde, segundo os autores as substituições nas posições 7 e 8 são importantes para aumentar a potência da atividade antimicrobiana. Desde então numerosas modificações estruturais tem 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. Estes compostos têm um grupo carboxílico na posição 3 e suas atividades antimicrobiana variam em função da adição dos grupos 6 – fluoro e 7-piperazina na molécula^{22,23}.

As FQs são intensamente usadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Sua principal via de eliminação é pela urina, onde aproximadamente 70% das fluorquinolonas excretadas permanecem de forma inalteradas e cerca de 30% na forma de seus metabólitos. As FQs são eficazes nas infecções do trato urinário, no tratamento de diarreia bacteriana, no tratamento de infecções dos tecidos moles, bem como em infecções intrabdominais e das vias respiratórias, incluindo aquelas causadas por microorganismos resistentes a múltiplos fármacos. Além de apresentarem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas²².

As FQs 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. No entanto, as recentes modificações possibilitam uma ótima combinação entre às propriedades antibacterianas e a potência, favorecendo sua ação e minimizando seus efeitos negativos. O modo de ação das FQs é

similar, porém numerosos derivados têm sido sintetizados no esforço de realçar o espectro antimicrobiano e atividade farmacológica além de minimizarem o risco de resistência das bactérias pela droga²². Nesse trabalho um método analítico para a determinação de enrofloxacinina será desenvolvido. A estrutura dessa fluorquinolona é indicada na Figura 3.

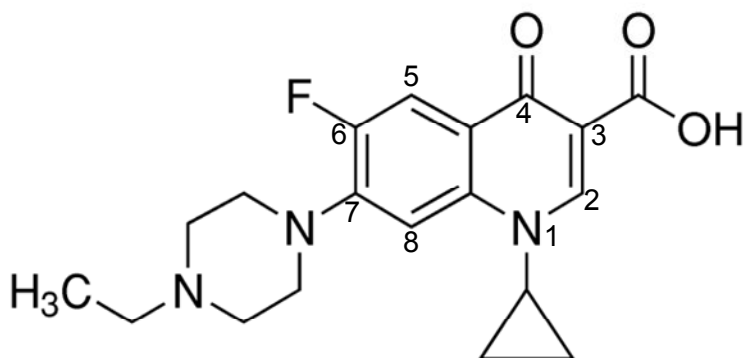


Figura 3: Estrutura da enrofloxacinina

A enrofloxacinina faz parte da terceira geração de fluoroquinolonas²⁴ e foi sintetizada pelos pesquisadores Grohe e Peterson da Bayer em 1980, sendo desenvolvida exclusivamente para uso em medicina veterinária e introduzida no mercado em 1988²⁵. Outras fluoroquinolonas têm licença para uso em animais e humanos (norfloxacinina, ciprofloxacina e ofloxacina)²⁶. A enrofloxacinina possui fórmula molecular igual a $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ e massa molar igual a $359,4 \text{ g mol}^{-1}$.

1.5. Modo de ação

As FQs atuam na inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano, ambas são topoisomerasas do DNA bacteriano e são essenciais para sua replicação. As enzimas são a DNA-girase e a topoisomerase IV cujas funções são romper a ligação entre as fitas da dupla hélice de DNA, se posicionar no local da ruptura da fita dupla e reparar simultaneamente esses locais de ruptura. A DNA-girase 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 transição (removendo os superespirais positivos), remover os “nós” que se formam no DNA bacteriano e ajudar a curvar e dobrar o mesmo. Já a topoisomerase IV tem a principal função de separar o DNA cromossômico replicado nas células-filhas durante a divisão celular²².

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 FQs-enzima-DNA bloqueia progressivamente a sua replicação, inibindo a síntese normal do DNA bacteriano, resultando na morte rápida da célula da bactéria. 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 IV²². A enrofloxacin tem excelente atividade contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos²⁴.

As FQs têm grande efeito no tratamento de infecções tanto hospitalares quanto comunitárias. Porém, o desenvolvimento de resistências às FQs tem colocado em risco a utilização clínica desta classe de antimicrobianos, principalmente pelo uso descontrolado de medicamentos tanto em animais quanto no homem. O uso rotineiro desses medicamentos para controle de doenças em animais pode resultar também na presença de resíduos em vários gêneros alimentícios (ovos, leite, carnes, etc) de origem animal que podem induzir resistência patogênica aos antibióticos usados na medicina humana. O nível terapêutico recomendado está na ordem de 5 mg L⁻¹ para as FQs. A União Européia estabeleceu limites máximos de resíduos (MRLs) para várias

quinolonas (inclusive para enrofloxacin) em diferentes alimentos de origem animal²⁷. Para o leite bovino o MRL para enrofloxacin é de 100 mg Kg⁻¹.

1.6.

Métodos analíticos para determinação de enrofloxacin

O grande interesse nessa classe de composto levou ao desenvolvimento de vários métodos analíticos que determinam as FQs em diferentes matrizes, como, formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e alimentos de origem animal. Belal *et al.*²⁸ publicaram uma extensa revisão contendo 270 referências sobre os métodos analíticos para a determinação de quinolonas e FQs, incluindo a enrofloxacin, até o ano de 1999. Dentre os métodos instrumentais revelantes descritos para a determinação da enrofloxacin se encontram a espectrofluorimetria, HPLC-UV-vis, HPLC-Fluorimetria, HPLC-MS, métodos microbiológicos e CE com detecção fotométrica de absorção no UV-vis. Além desses, a partir de 1999 são citados métodos voltamétricos e espectrofotométricos para determinação de enrofloxacin.

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

Navalon *et al.*²⁹ propuseram dois métodos para determinação de enrofloxacin em formulações comerciais e em urina de cães usando a voltametria adsorviva (AdSV). Em um dos trabalhos, os autores utilizaram a calibração univariada para a análise de enrofloxacin em formulações comerciais e, no outro trabalho, aplicou a regressão de componente principal (PCR) para determinar a enrofloxacin na presença do seu metabólito ciprofloxacina²⁹. As faixas lineares de concentração utilizadas foram de 4 – 25 e 18 – 55 ng mL⁻¹ usando um potencial de -0,3 V e um tempo de 180 e 60 s para acumulação. A primeira faixa de concentração foi usada também para o método onde foi aplicado o PCR. Os limites de detecção para as duas faixas de trabalho foram 1,3 ng mL⁻¹ e 5,8 ng mL⁻¹ respectivamente. Para os limites de quantificação foram encontrados os valores de 4,0 e 18,0 ng mL⁻¹ para as duas faixas de trabalho respectivamente.

O primeiro método utilizando a técnica voltametria para determinação de enrofloxacin (juntamente com a sparfloxacina e fleroxacin) foi desenvolvido em

2000 por Rizk *et al.*³⁰, sendo aplicado em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos (urina e sangue). O método usou corrente direta (DC), pulso diferencial (DPP) e corrente alternada (AC_i). Todas as fluorquinolonas apresentaram pulsos catódicos em tampão Britton-Robinson na faixa de pH entre 4,0 e 11,98. O limite de detecção do método para enrofloxacinina foi igual a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o modo DPP.

Alguns métodos por espectrofotometria de absorção UV-vis são utilizados para determinar a enrofloxacinina em formulações farmacêuticas. Esses métodos apresentam vantagens por serem de baixo custo, simples e disponíveis nas maiorias dos laboratórios. Hassan *et al.*³¹ avaliaram o uso de N-bromosuccinimida (NBS) como um reagente analítico para determinação espectrofotométrica de 11 FQs em formulações farmacêuticas. O método envolve a reação das FQs com o NBS e subsequente medição do excesso de NBS através da reação com p-fenilenodiamina (PDA) para gerar um produto de coloração violeta que tem máximo de absorção em 530 nm. Diferentes variáveis que afetam a reação (concentração NBS, concentração de PDA, pH da reação, tempo de reação e diluição em solventes) foram estudados e otimizados. A interferência do ácido ascórbico, que é um excipiente comumente utilizado, foi evitado por uma pré-oxidação com brometo de potássio antes de aplicar o processo analítico. Para a análise da enrofloxacinina os valores de 1,1 e 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram encontrados para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Métodos espectrofotométricos com formação de complexos de transferência de carga entre as FQs e diferentes reagentes também são citados para determinação de FQs em formulações farmacêuticas. Mostafa *et al.*³² desenvolveram um método analítico para determinação da enrofloxacinina, e também de ciprofloxacina e pefloxacina baseado na reação com três diferentes reagentes receptores. A determinação da enrofloxacinina foi realizada com apenas dois dos três receptores testados, o ácido cloranílico (CL), que formou complexo de transferência de carga com comprimento de onda máximo em 520 nm, e o tetracianoetileno (TCNE), que formou um complexo de comprimento de onda máximo em 290 nm. O método foi aplicado em solução oral Enroxil 10%. A faixa de trabalho desse método para a enrofloxacinina foi de 20 a 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método com CL e de 0,2 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método TCNE. Os métodos espectrofotométricos são geralmente aplicados para determinação de FQs isoladas por causa da interferência mútua que ocorre em misturas desses compostos.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo as determinações de FQs, principalmente em matrizes complexas (fluidos biológicos e alimentos) ou em amostras contendo misturas de quinolonas, envolve o uso de HPLC ou de CE com diversos modos de detecção (fotometria de absorção e fluorescência). As FQs apresentam intensa fluorescência natural que é decorrente de uma estrutura molecular relativamente rígida contendo um sistema de anéis conjugados ricos em elétrons π , onde se encontram alguns grupos substituintes que favorecem o aumento da eficiência quântica fluorescente (grupos carboxílicos, por exemplo). Essa característica faz com que a detecção fluorimétrica seja preferencial em análises de FQs por HPLC²².

O recente trabalho de Uslu *et al.*³³ foi realizado para determinar duas FQs (enrofloxacin e ciprofloxacina) em matrizes de solo. O mecanismo de extração das FQs foi realizado aplicando vórtex, ultrassom e extração em fase sólida. A análise foi realizada por HPLC com detecção por fluorescência. A extração mais eficiente foi encontrada com tampão fosfato em pH 3 em combinação de 50% de acetonitrila com ciclo de extração realizado por quatro vezes. As condições de análise foram: coluna de fase reversa C-18, temperatura de 30°C, eluição isocrática com fase móvel contendo ácido orto-fosfórico: acetonitrila 80:20% v/v e detecção por fluorescência com excitação a 280 nm e emissão a 450 nm.

Herranz *et al.*²⁷ desenvolveram um método analítico para determinar enrofloxacin, ciprofloxacina e sarafloxacin em ovos, aplicando extração por líquido pressurizado e HPLC com detecção por fluorescência. A extração ótima foi encontrada usando fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH= 3,0): acetonitrila 50:50% v/v. A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna C-18 e com um programa de gradiente com fase móvel contendo ácido ortofosfórico 25 mmol L⁻¹ (pH = 3,0): acetonitrila. A detecção foi feita por fluorescência com excitação a 280 e emissão a 440 nm. O limite de decisão e a capacidade de detecção reportada para o método foram estabelecidos dentro da faixa 17-24 ng g⁻¹ e 30-41 ng g⁻¹, respectivamente. Outro método que utiliza HPLC com detecção por fluorescência com DAD foi desenvolvido por Marazuela e Moreno-Bondi para determinação de resíduos de ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, donofloxacin e sarafloxacin em amostra de leite usando a norfloxacina como padrão interno³⁴. Extração em fase sólida foi utilizada para clean-up e pré-concentração das amostras. As FQs também foram separadas em fase reversa C18 com uso de programa de eluição em gradiente (mesma combinação de fase móvel utilizada no método citado anteriormente). A detecção por absorção foi fixado em 298 nm para a determinação da marbofloxacina e os comprimentos de

onda fixados para detecção por fluorescência (excitação/emissão) das demais fluorquinolonas foi igual a 280/440. A faixa de trabalho para a enrofloxacin foi entre 8,3-150 ng mL⁻¹ e o LD igual a 3 ng mL⁻¹, o que atende os valores de Limites Máximo de Resíduo (MRLs) estabelecida para esses antibióticos no Conselho de Regulamentação EU 2377/90³⁵. As FQs também foram determinadas em amostras de urina no método desenvolvido por Mansilla *et al.*²³. A técnica HPLC-fluorescência foi utilizada para separação das FQs (enoxacina, norfloxacin, ofloxacin e enrofloxacin) com método de eluição isocrática usando uma mistura de tetrahidrofurano: tampão fosfato (pH =3,00, 30 mmol L⁻¹) na proporção 8:92% v/v como fase móvel. A detecção fluorimétrica foi realizada com excitação a 277 e emissão a 444 nm. O limite de detecção de 15,0 ng mL⁻¹ foi obtido para determinação da enrofloxacin.

Outra técnica bastante utilizada para determinação de FQs é a CE. Desde 1999 vários métodos analíticos para FQs utilizando essa técnica foram desenvolvidos em seus vários modos de separação (isotacoforese, cromatografia capilar micelar, etc). Vários modos de detecção podem ser utilizados em eletroforese como, detecção UV-vis, espectrometria de massa (MS), detecção amperométrica (AD) e detecção por fluorescência induzida por laser (LIF).

Kowalski e Plenis³⁶ desenvolveram um método para determinação simultânea de seis quinolonas em amostras de tecidos de aves e suínos usando CE com detecção UV. As amostras foram preparadas por extração em fase sólida em cartuchos de C-18. As curvas de calibração foram lineares na faixa de trabalho entre 10-1000 ng g⁻¹ para todas as FQs incluindo a enrofloxacin. Os valores dos limites de decisão e capacidade de detecção foram encontrados na faixa entre 3,2-16,9 e 3,5-20,3 ng g⁻¹, respectivamente, para todas as quinolonas.

Zhao *et al.*³⁷ desenvolveram um método CE utilizando o modo de separação por cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC) com auxílio de técnica de concentração da amostra no capilar (concentração em linha) para análise de quinolonas em amostras de tecido de porco. Os autores aplicaram o método para determinação de quatro quinolonas entre elas a enrofloxacin. As amostras foram desproteínadas com ácido tricloracético; o eletrólito de trabalho para separação das quinolonas continha 20 mmol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ mais 80 mmol L⁻¹ de dodecil sulfato de sódio (SDS), com pH ajustado para 9,6; injeção da amostra foi realizada por pressão (15 x 10² Pa) por 200 segundos; a voltagem aplicada durante a separação foi de 18 kV; a detecção foi obtida em 278 nm. A

separação foi realizada em um capilar de sílica fundida de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo) e diâmetro 75 μm . O método apresentou um limite de detecção para enrofloxacinina igual a 0,020 mg L^{-1} . Segundo os autores o método pode ser aplicado para análise de resíduos de quinolonas em diversos alimentos de origem animal.

Hernández *et al.*³⁸ determinaram a enrofloxacinina além da ciprofloxacina e a flumequina em plasma de porco por eletroforese capilar em zona usando o modo de isotacoforese capilar (ITP-CZE). Segundo os autores, a CZE-ITP é uma técnica que permite aumentar a sensibilidade (em até 40 vezes) quando comparada com CZE. As amostras foram tratadas por meio de extração em fase sólida e o LD para a enrofloxacinina foi 85 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os autores indicaram esta metodologia como alternativa à técnica de HPLC em análises residuais de quinolonas em amostras biológicas.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e aplicar dois métodos analíticos distintos. A cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC) foi escolhida como técnica analítica para determinar os pesticidas picoxistrobina e piraclostrobina por ser uma técnica de separação para compostos neutros e por não ter sido aplicada ainda para esses dois compostos específicos. Os pesticidas picoxistrobina e piraclostrobina foram selecionados pela necessidade de desenvolver métodos analíticos capazes de determinar-los em diferentes tipos de amostra principalmente em níveis residuais. A segunda técnica analítica utilizada no trabalho foi a fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) com o propósito de desenvolver um método analítico para determinar a enrofloxacin em amostras de formulações farmacêuticas.

1.7.2. Objetivo específico

A seguir alguns objetivos específicos da realização desse trabalho serão apontados.

- Desenvolvimento de método analítico utilizando a MECC para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina:
 - i. Conhecer a técnica MECC em termos dos cuidados necessários para possibilitar uso diário com reprodução de resultados, já que esse é o primeiro trabalho de pós-graduação realizado no Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica Aplicada (LEEA) utilizando essa técnica.
 - ii. Otimizar as condições instrumentais e experimentais para a separação e determinação dos pesticidas por MECC.
 - iii. Aplicar recursos experimentais e instrumentais para aumentar a sensibilidade do método.
 - iv. Aplicar o método analítico desenvolvido em amostras reais.

- Desenvolvimento de método analítico fosforimétrico para determinação da enrofloxacina:
- i. Dar continuidade ao trabalho realizado por Nava²² utilizando a SS RTP para desenvolver um método para a enrofloxacina.
 - ii. Estudar as características fosforescentes da enrofloxacina em substrato sólido utilizando vários sais de átomos pesados como indutores de fosforescência.
 - iii. Otimizar, por estudo univariado, as condições experimentais: presença de surfactante modificador de superfície de celulose, influência de concentração hidrogeniônica na solução do analito e estudo do tempo de exposição ao UV para a formação de fotoproduto de sinal mais estável.
 - iv. Validar o método por comparação dos resultados com aqueles obtidos com um método de referência por HPLC.
 - v. Aplicar o método em formulações farmacêuticas (solução e comprimido) contendo a enrofloxacina.