



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com
detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de
ciprofloxacina

JÉSSICA SANTOS STEFANO

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

Fevereiro

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com
detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de
ciprofloxacina

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química do
Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Química.

Aluna: Jéssica Santos Stefano

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Área de concentração: Química Analítica

Fevereiro

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S816u Stefano, Jéssica Santos, 1991-
2016 Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de ciprofloxacina / Jéssica Santos Stefano. - 2016.
74 f. : il.

Orientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Eletrodos - Teses. 3. Nanotubos de carbono - Teses. 4. Antibióticos - Teses. I. Abarza Muñoz, Rodrigo Alejandro. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 229/PPQUI.**

DATA: 17/02/2016

DISCENTE: Jessica Santos Stefano

MATRÍCULA: 11422QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de ciprofloxacina.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos analíticos nas áreas de energia e meio-ambiente.

Às nove horas do dia dezessete de fevereiro do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Lucas Franco Ferreira, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rodrigo Amorim Bezerra da Silva e Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 25 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
UFVJM

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva
IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz – IQUFU

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Deus, por tudo.
- ❖ Ao meu marido Fernando, por ter paciência e me apoiar sempre, não importa o quanto difícil fosse a jornada.
- ❖ À minha família, que apesar das desavenças, sempre está do meu lado me apoiando, principalmente meus pais, Walter e Josefa, que fizeram e ainda fazem tudo o que podem para me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente.
- ❖ Ao meu orientador, Prof. Rodrigo Muñoz pela confiança, paciência e conhecimento proporcionados, me ajudando a melhorar profissionalmente.
- ❖ Ao meu co-orientador, Eduardo Richter por toda a contribuição profissional e apoio durante o trabalho.
- ❖ Ao querido amigo Rodrigo Montes (banana) por ter me ajudado desde o começo na iniciação científica, com toda paciência, sempre me apoiando nos momentos de aperto e me guiando quando nada dava certo.
- ❖ Aos amigos do NuPE por toda a ajuda e companheirismo, todos são muito especiais, adoro vocês.
- ❖ Aos professores do IQ-UFU por contribuir com minha formação.

- ❖ Aos meus amigos da graduação Oswaldo, Gaby, Renato, Ana Paula, Paulo, Lets, Sabrina, Mari, Fernando, Daiane (se esqueci alguém, desculpe) pela ajuda e força durante todo o período de estudos, e também por todos momentos de descontração.
- ❖ Aos técnicos e funcionários da UFU pela ajuda sempre que necessário.
- ❖ Aos membros da banca pelo aceite e pelas contribuições concedidas no aprimoramento deste trabalho.
- ❖ À CAPES pelo apoio financeiro concedido.
- ❖ Ao Instituto de Química da UFU pelo espaço cedido e pela oportunidade de realizar os projetos de pesquisa desenvolvidos até então.

Obrigada!

RESUMO

O presente trabalho apresenta o uso de eletrodos impressos de carbono modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT-SPEs) adaptados para dois diferentes sistemas de análise (análise por injeção em fluxo - FIA e análise por injeção em batelada - BIA) empregando-se amperometria convencional na determinação de ciprofloxacina. Inicialmente, voltamogramas cíclicos do analito foram realizados para definir o melhor eletrodo e pH para trabalho. Observou-se que os eletrodos impressos (SPEs) forneceram respostas de corrente muito superiores àquelas obtidas por eletrodo de carbono vítreo sem modificação. O SPE modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas forneceu ainda um ligeiro aumento na corrente de pico quando comparado ao SPE de carbono sem modificações. O eletrólito empregado neste trabalho foi o tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ em pH otimizado de 4,0. Voltamogramas hidrodinâmicos foram construídos para a escolha do potencial de trabalho para os estudos amperométricos. Foi observado que a ciprofloxacina possui pico de oxidação que se inicia em +0,8 V, e com o aumento do potencial, o sinal de corrente também aumenta, sendo o potencial de +1,0 V escolhido para trabalhar tanto no sistema BIA quanto no sistema FIA. Para cada um dos métodos de análise foram obtidos os valores ótimos de vazão, 42 e 153 µL s⁻¹, e volume injetado, 250 e 50 µL s⁻¹, respectivamente para FIA e BIA. Nestas condições, fez-se o estudo de repetibilidade e obteve-se valores de DPR de 1,7 e 4,9 % para FIA e BIA, respectivamente. Os métodos apresentaram faixa linear de resposta de 5 – 200 µmol L⁻¹ para FIA ($r = 0,998$ e sensibilidade de 0,0768 µA L µmol⁻¹) e 5 – 150 µmol L⁻¹ para BIA utilizando-se agitação na célula ($r = 0,999$ e sensibilidade de 0,1115 µA L µmol⁻¹). Dessa forma, foi possível determinar ciprofloxacina em duas amostras farmacêuticas diferentes e os resultados obtidos com os métodos propostos foram estatisticamente similares aos obtidos por eletroforese capilar com 95% de confiança. A frequência analítica foi de 99 e 130 injeções por hora e os limites de detecção foram de 0,06 e 0,07 µmol L⁻¹ para FIA e BIA com agitação, respectivamente. Apesar da maior sensibilidade oferecida pelas altas vazões do sistema BIA, os limites de detecção usando FIA e BIA foram próximos. No entanto, a frequência analítica e precisão do método BIA foram superiores para a determinação de ciprofloxacina, além das características portáteis deste sistema.

Palavras-chave: Eletrodos impressos; Nanotubos de carbono; Análise por Injeção em Fluxo (FIA); Análise por Injeção em Batelada (BIA); Antibiótico.

ABSTRACT

The present work presents the use of multi-walled carbon-nanotube modified screen-printed electrodes (MWCNT-SPEs) adapted for two different analytical systems (flow injection analysis - FIA and batch injection analysis - BIA) employing conventional amperometry for ciprofloxacin determination. Initially, cyclic voltammograms of the analyte were performed to define the best electrode and working pH. It was noted that screen-printed electrodes (SPEs) supplied current responses superior to those obtained by glassy-carbon electrode without modification. The SPE modified with multi-walled carbon nanotubes provided a slight increase in peak current when compared to unmodified carbon SPE. The electrolyte used in this study was 0.1 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer in optimum pH of 4.0.

Hydrodynamic voltammograms were obtained to select the working potential for amperometric studies. It was noted that ciprofloxacin has oxidation peak starting at +0.8 V, and with the rising of the potential, the current signal also increases, and the potential of +1.0 V was chosen to work in both systems BIA and FIA. For each one of the analytical methods, it was obtained optimal values of flow rate and injected volume, 42 and 153 μ L s⁻¹, and injected volume, 250 and 50 μ L s⁻¹, respectively for FIA and BIA. Under these conditions, repeatability study was performed and RSD values of 1.7 and 4.9 % for FIA and BIA, respectively. The methods presented linear range of 5 - 200 μ mol L⁻¹ for FIA ($r = 0.998$ and sensitivity of 0.0768 μ A L μ mol⁻¹) and 5 - 150 μ mol L⁻¹ for BIA with stirring ($r = 0.999$ and sensitivity of 0.1115 μ A L μ mol⁻¹). Therefore, it was possible to determine ciprofloxacin in two different pharmaceutical samples and the results obtained with the proposed methods were statistically similar to those obtained by capillary electrophoresis with 95 % confidence. The analytical frequency values were 99 and 130 injections per hour and detection limits were 0.06 and 0.07 μ mol L⁻¹ for FIA and BIA with stirring, respectively. Despite the higher sensitivity provided by higher flow rates of the BIA system, the detection limits using FIA and BIA were similar. However, the analytical frequency and precision of the BIA method was superior to the determination of ciprofloxacin, beyond the portable characteristics of this system.

Keywords: Screen-Printed Electrodes; Carbon nanotubes; Flow-Injection Analysis (FIA); Batch-Injection Analysis (BIA); Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da ciprofloxacina (CFX).	9
Figura 2 - Esquema ilustrativo de um eletrodo impresso de carbono típico com os três eletrodos: trabalho (WE), referência (RE) e contra eletrodo (CE).	12
Figura 3 - Estrutura dos nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) e de paredes multiplas (MWCNT).	15
Figura 4 - (A) Disposição dos componentes de um sistema FIA típico de linha única; (B) Esquema do gradiente de concentração das amostras (ou padrões); (C) sinais analíticos obtidos.	17
Figura 5 - Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido.	20
Figura 6 - Curvas obtidas por voltametria cíclica: (A) Esquema de varredura de potencial <i>vs</i> tempo; (B) Voltamograma da corrente obtida em função do potencial. E_i : potencial inicial; E_s : potencial de inversão; E_f : potencial final.	24
Figura 7 - Imagem do sistema BIA utilizado nas análises, no qual: (A) Sistema completo, (B) Célula BIA aberta com todos seus componentes, (C) Célula BIA fechada e (D) SPE inserido na célula com a ponta da micropipeta eletrônica em configuração wall-jet.	29
Figura 8 - Imagem do sistema FIA utilizado nas análises (à esquerda) e foto da célula adaptada para SPEs ampliada aberta e fechada, onde (↓) representa a entrada do fluxo e (↑) representa a saída do fluxo.	31
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos em MWCNT-SPE para o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, realizado em solução de 0,1 mol L ⁻¹ KCl / 1×10^{-3} mol L ⁻¹ K ₄ Fe(CN) ₆ . Velocidades de varredura: 20, 40, 60, 80 e 100 mV s ⁻¹	34
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos de 1 mmol L ⁻¹ de CFX em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 4,0) em diferentes eletrodos (GCE <i>vs.</i> Ag/AgCl em KCl saturado, C-SPE e MWCNT-SPE). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	36
Figura 11 - Processo de oxidação eletroquímica resumido para a ciprofloxacina.	37
Figura 12 - Voltamogramas cíclicos de CFX 1 mmol L ⁻¹ em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH obtidos em MWCNT-SPE. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . A curva de calibração inserida corresponde ao plot de E versus pH.	37
Figura 13 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando-se os valores de corrente de pico (média de 3 injeções) para CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função dos potenciais aplicados no sistema FIA. Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0; Eletrodos: MWCNT-SPE e C-SPE.	38

- Figura 14** - Otimização dos parâmetros FIA: variação de (A) volume injetado (100, 200, 250 e 300 μ L) e de (B) vazão (33, 42, 50 e 75 μ L s $^{-1}$) com base em injeções em triplicata de 50 μ mol L $^{-1}$ de CFX. Eletrólito: solução tampão BR pH 4,0.....39
- Figura 15** - Amperograma obtido para injeções sucessivas de CFX 50 μ mol L $^{-1}$ (n = 15). Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ pH 4,0; volume injetado: 250 μ L; vazão: 42 μ L s $^{-1}$40
- Figura 16** - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema FIA de soluções padrão de CFX (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 μ mol L $^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ pH 4,0; volume injetado: 250 μ L; vazão: 42 μ L s $^{-1}$41
- Figura 17** - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema FIA de soluções padrão de CFX (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 μ mol L $^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida; A1_d = amostra líquida dopada com padrão de CFX 25 μ mol L $^{-1}$; A2 = comprimido e A2_d = comprimido dopado com padrão de CFX 25 μ mol L $^{-1}$). A curva de calibração está inserida na figura. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ pH 4,0; volume injetado: 250 μ L; vazão: 42 μ L s $^{-1}$42
- Figura 18** - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando-se os valores de corrente de pico (média de 3 injeções) para CFX 50 μ mol L $^{-1}$ em função dos potenciais aplicados no sistema BIA. Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ pH 4,0; Eletrodos: MWCNT-SPE e C-SPE44
- Figura 19** - Otimização dos parâmetros BIA: variação de (A) volume injetado (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ L) e de (B) velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica (28, 43, 57, 75, 100, 113, 153, 193, 257 e 345 μ L s $^{-1}$) com base em injeções em triplicata de 50 μ mol L $^{-1}$ de CFX. Eletrólito: tampão BR pH 4,0.....45
- Figura 20** - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 μ mol L $^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ pH 4,0; volume injetado: 50 μ L; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 μ L s $^{-1}$46
- Figura 21** - Otimização dos parâmetros BIA empregando-se sistema de agitação: variação de (A) volume injetado (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ L) e de (B) velocidade de dispensa da micropipeta

eletrônica (28, 43, 57, 75, 100, 113, 153, 193, 257 e 345 $\mu\text{L s}^{-1}$) com base em injeções em triplicata de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CFX. Eletrólito: tampão BR pH 4,0.....	47
Figura 22 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA, empregando-se agitação, de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	48
Figura 23 - Amperograma obtido para injeções sucessivas de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n = 15) no sistema BIA empregando-se agitação magnética. Potencial de trabalho: +1,0 V; Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	49
Figura 24 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA, utilizando agitação magnética, de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida; A1 _d = amostra líquida dopada com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; A2 = comprimido e A2 _d = comprimido dopado com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A curva de calibração está inserida na figura. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de recuperação obtidos por análise em FIA-AMP após dopagem da amostra com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	43
Tabela 2 - Valores de recuperação obtidos por análise em BIA-AMP após dopagem da amostra com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	51
Tabela 3 - Características analíticas e parâmetros para os métodos propostos na determinação de ciprofloxacina nas condições otimizadas.....	51
Tabela 4 - Comparação dos resultados obtidos na determinação de CFX em formulações farmacêuticas por FIA-AMP, BIA-AMP e CE-C ⁴ D (n = 3).	52
Tabela 5 - Comparação das características analíticas dos métodos propostos (BIA - com agitação) e FIA com outros métodos eletroanalíticos para a determinação de ciprofloxacina reportados na literatura.	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β-CD - β -ciclodextrina

a - Coeficiente angular da curva analítica ou sensibilidade da calibração

A - Área ativa do eletrodo

AMP - Amperometria

BIA - Análise por injeção em batelada, do inglês, “*Batch Injection Analysis*”

BIA-SPE - Análise por injeção em batelada com célula adaptada para eletrodos impressos, do inglês, “*Batch-Injection Analysis using Screen-Printed Electrodes*”

BR - Britton-Robinson

CE - Contra eletrodo, do inglês “*Counter Electrode*”

CE-C⁴D - Eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente, do inglês, “*Capillary Electrophoresis Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector*”

CFX - Ciprofloxacina

C-SPE - Eletrodo impresso de carbono

C₀ - Concentração das espécies reduzidas ou oxidadas

D - Coeficiente de difusão da espécie eletrolítica

DDB - Diamante Dopado com Boro

DP_b - Desvio padrão relativo do branco

DPR - Desvio Padrão Relativo

DPV - Voltametria de pulso diferencial, do inglês, “*Differential-Pulse voltammetry*”

EPC - Eletrodo de Pasta de Carbono

FIA - Análise por injeção em fluxo, do inglês, “*Flow -injection Analysis*”

GCE - Eletrodo de carbono vítreo, do inglês, “*Glassy-Carbon Electrode*”

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance, do inglês, “*High-Performance Liquid Chromatography*”

ip - Corrente de pico

L-Arg - L-Arginina

LD - Limite de detecção, do inglês, “*Limit of Detection*”

LQ - Limite de quantificação, do inglês, “*Limit of Quantification*”

LSV - Voltametria de varredura linear, do inglês, “*Linear-Sweep Voltammetry*”

MWCNT - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês, “*Multi-walled Carbon Nanotubes*”

n - Número de elétrons envolvidos na reação redox

PAR - “*Poly (Alizarin Red)*”

ppm - partes por milhão

ppb - partes por bilhão

PVC - Policloreto de vinila, do inglês “*Polyvinyl chloride*”

RE - Eletrodo de referência, do inglês, “*Reference Electrode*”

SPE - Eletrodo impresso, do inglês, “*Screen-Printed Electrode*”

SWV - Voltametria de onda quadrada, do inglês, “*Square-Wave Voltammetry*”

UV - Espectrofotômetro ultravioleta, do inglês, “*UltraViolet spectrophotometry*”

v - Velocidade de varredura

VC - Voltametria Cíclica

WE - Eletrodo de trabalho, do inglês, “*Working Electrode*”

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Analito Estudado.....	9
1.2	Eletrodos Impressos (SPEs).....	12
1.3	Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	15
1.4	Análise por Injeção em Batelada (BIA).....	19
1.5	Técnicas Eletroanalíticas	22
1.5.1	Voltametria Cíclica (VC)	23
1.5.2	Amperometria (AMP)	25
2	OBJETIVOS.....	26
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
3.1	Instrumentação.....	27
3.2	Reagentes e Soluções.....	27
3.3	Medidas Eletroquímicas	28
3.3.1	Sistema BIA	29
3.3.2	Sistema FIA.....	30
3.3.3	Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1	Estudo da Área Eletroativa do Eletrodo	33
4.2	Determinação de Ciprofloxacina	35
4.2.1	Análise por FIA com detecção amperométrica	38
4.2.2	Análise por BIA com detecção amperométrica.....	43
4.3	Comparação de Métodos	51
5	CONCLUSÃO.....	55
6	TRABALHOS REALIZADOS.....	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Analito Estudado

Ciprofloxacina (CFX), nome usual do Ácido-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-chinolincarboxílico (Figura 1), é um agente quimioterápico sintético do grupo das fluoroquinolonas utilizado para tratar infecções bacterianas graves bloqueando a síntese do DNA bacteriano (Katzung *et al.*, 2014; Montes *et al.*, 2014).

O desenvolvimento das fluoroquinolonas data de 1962, quando Lesher e colaboradores (Lesher *et al.*, 1962), na tentativa de sintetizar um composto antimarial a partir da cloroquina, produziram acidentalmente a 7-cloroquinolina, uma substância que apresentou ação contra bactérias Gram-negativas. A partir dos resultados desse estudo foi obtido o ácido nalidíxico, sendo este composto considerado a primeira quinolona de uso clínico. As quinolonas são agrupadas em três gerações: a primeira abrange as primeiras quinolonas sintetizadas, sendo estas, quinolonas não fluoradas; a segunda é formada por quinolonas mono fluoradas e a terceira é composta por quinolonas di e tri-fluoradas. A ciprofloxacina é uma quinolona de segunda geração e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 1 (Bilibio, 2014).

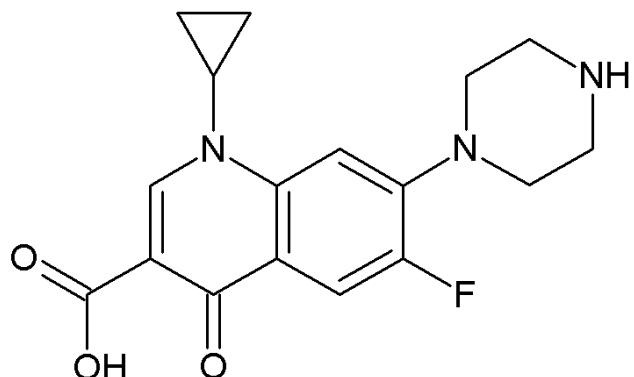


Figura 1 - Fórmula estrutural da ciprofloxacina (CFX).

Fonte: Chemicalize.org.

A ciprofloxacina é ativa contra um largo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além disso, a agência Food and Drug Administration recomendou seu uso para combate do antrax. Segundo Sulochana *et al.*, 2005, este composto é geralmente utilizado no tratamento de pacientes com tuberculose resistente a medicamentos, porém, o uso

indiscriminado do mesmo para tratar doenças bacterianas agudas comuns em países endêmicos de tuberculose resulta na emergência da *M. Tuberculosis* resistente a estes medicamentos.

Este composto é também rotineiramente prescrito para prevenir doenças veterinárias, porém, seu uso múltiplo e generalizado poderia ser responsável pela resistência de outros patógenos como *Campylobacter*, *Salmomella* e *Escherichia coli*, e seus resíduos em alimentos de origem animal ou agrícolas apresentam riscos potenciais para os consumidores (Shan *et al.*, 2015).

Uma vez que a ciprofloxacina é um composto de grande importância farmacêutica, nos últimos anos houve um interesse crescente no desenvolvimento de métodos analíticos precisos que são válidos para a quantificação deste antibiótico. Uma vez ingerida, a principal via de excreção da CFX é através da urina, e estima-se que a concentração na urina ultrapasse 300 mg L⁻¹ se sua determinação for feita após 4 horas após a dosagem (Henderson *et al.*, 1999; Pulgarín *et al.*, 2012).

A determinação de ciprofloxacina tem sido reportada por diferentes métodos analíticos, incluindo cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Neckel *et al.*, 2002; Idowu e Peggins, 2004; Vybiralova *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006), espectrofotometria na região do UV (Nagaralli *et al.*, 2002; Pascual-Reguera e Parras, 2004), espectrofluorimetria (Navalón *et al.*, 2000; Michalska *et al.*, 2004) e eletroforese capilar (Hernández *et al.*, 2002; Michalska *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2008; Piñero *et al.*, 2012).

Há uma procura cada vez maior no desenvolvimento de métodos analíticos portáteis para análises in loco de amostras clínicas e ambientais de alimentos (Wang, 2002). Métodos eletroquímicos tem cumprido esta demanda em análise química porque a instrumentação necessária é completamente portátil devido ao desenvolvimento de eletrodos impressos (SPEs) (Tse *et al.*, 1995; Nascimento e Angnes, 1998; Metters *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Métodos eletroanalíticos para a determinação de ciprofloxacina tem sido reportados usando diferentes eletrodos de trabalho, como por exemplo, eletrodo de mercúrio (O'dea *et al.*, 1991), pasta de carbono (O'dea *et al.*, 1991; Yi e Li, 2007; Zhang *et al.*, 2013), diamante dopado com boro (Montes *et al.*, 2014; Garbellini *et al.*, 2015), nanotubos de carbono (Ensafi *et al.*, 2010; Fotouhi e Alahyari, 2010; Ensafi *et al.*, 2012) e eletrodos modificados com grafeno (Zhang *et al.*, 2014).

O primeiro trabalho eletroquímico sobre a ciprofloxacina consistiu no emprego de eletrodo de mercúrio para investigar a redução eletroquímica de CFX. O sinal de CFX foi obtido em tampão BR (pH = 8,5). Neste pH, utilizando-se eletrodo de mercúrio, a CFX forneceu dois sinais de redução, em -1,44 e -1,64 V (vs. Ag/AgCl) (O'dea *et al.*, 1990). CFX foi quantificada

em formulações farmacêuticas neste trabalho, com faixa linear de 0,5 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção 0,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O estudo descrito por Yi e Li em 2007 aborda a determinação de CFX em fármacos empregando-se eletrodo de pasta de carbono e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) na presença de brometo de cetiltrimetilamônio, como eletrólito suporte. Neste trabalho utilizou-se voltametria de pulso diferencial e observou-se oxidação da CFX em + 0,86 V, a faixa linear de trabalho foi de 0,1 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o limite de detecção de 0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Zhang *et al.* (2013) também utilizaram eletrodo de pasta de carbono, porém, com grafite modificado com β -ciclodextrina e L-Arginina por eletropolimerização, e assim obtiveram maior faixa linear (0,05 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) além de menor limite de detecção (0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Neste trabalho foi utilizado como eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 empregando-se voltametria de pulso diferencial (0,8 a 1,3 V).

Há alguns trabalhos na literatura que empregaram eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) para a determinação de CFX. Montes *et al.*, 2014, por exemplo, utilizaram este eletrodo em meio de tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH = 10) e obteve sinal de oxidação da CFX em + 1,2 V (BIA-AMP), faixa linear de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Garbellini *et al.* (2015) também utilizaram DDB como eletrodo de trabalho em meio de tampão BR 0,1 mol L^{-1} (pH = 7). Os autores deste trabalho utilizaram voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada para a determinação de CFX em amostras biológicas, e obtiveram faixas lineares de 0,5 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, além de limites de detecção de 0,44 e 2,46 para ambos os métodos, respectivamente.

Em outros trabalhos, empregou-se GCE modificado com MWCNT. Ensafi *et al.* (2010) determinaram CFX em amostras biológicas e farmacêuticas utilizando este tipo de eletrodo, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,0) como eletrólito suporte e empregando voltametria de varredura linear. Neste trabalho, foram obtidos valores de faixa linear de 3 a 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fotouhi e Alahyari (2010) também utilizou GCE-MWCNT para a determinação de CFX em amostras biológicas em tampão fosfato (pH = 7,0) e utilizou a técnica de cronoamperometria. Foi obtido neste estudo, valor de faixa linear de 40 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ensafi *et al.* (2012) também determinou CFX em amostras farmacêuticas e biológicas com este eletrodo, porém contendo nanopartículas de MgFe₂O₄. Os autores trabalharam em pH baixo (3,0) utilizando voltametria de varredura linear, e obtiveram faixa linear de 0,1 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Zhang *et al.* (2014) trabalharam com filme de compósito de grafeno e poli-alizarina (PAR) para a determinação de CFX em amostras farmacêuticas na presença de ácido ascórbico,

úrico e dopamina utilizando voltametria de pulso diferencial e utilizaram como eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 5,5). Neste trabalho, os autores obtiveram uma faixa linear de 0,04 a 120 µmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,01 µmol L⁻¹. Como pode ser observado, o uso de eletrodos impressos para a determinação de CFX não foi reportado até o momento na literatura, portanto, esta dissertação apresenta o potencial uso de SPEs para a determinação de ciprofloxacina.

1.2 Eletrodos Impressos (SPEs)

Eletrodos impressos, do inglês “*Screen Printed Electrodes*” (SPEs) são dispositivos planares descartáveis, os quais podem ser produzidos em grande escala ao longo de diferentes substratos e são planejados de acordo com sua aplicação (tipicamente eles contém os três eletrodos em um mesmo suporte). SPEs contendo diferentes eletrodos de trabalho tem sido aplicados para a determinação de diferentes analitos em amostras farmacêuticas (Couto *et al.*, 2016), ambientais (Bernalte *et al.*, 2012; Bernalte *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2014; Hayat e Marty, 2014; Tormin *et al.*, 2014) e clínicas (Bernalte *et al.*, 2012; Bernalte *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2014; Taleat *et al.*, 2014; Tormin *et al.*, 2014; Cumba *et al.*, 2015). A Figura 2 apresenta um eletrodo impresso de carbono típico com três eletrodos em uma mesma placa cerâmica, sendo este empregado neste trabalho.

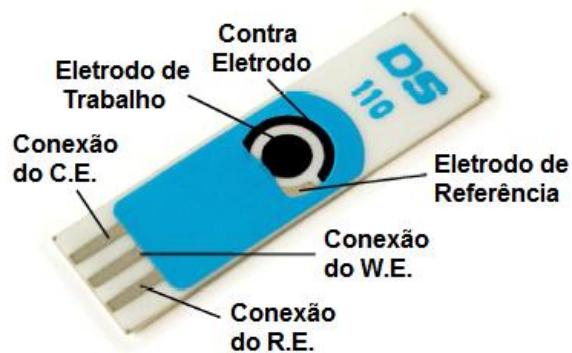


Figura 2 - Esquema ilustrativo de um eletrodo impresso de carbono típico com os três eletrodos: trabalho (WE), referência (RE) e contra eletrodo (CE).

Fonte: dropsens.com.

Com o advento da tecnologia de impressão na fabricação de SPEs, tem-se a oportunidade de se aplicar técnicas eletroquímicas de análise fora do laboratório, transformando sistemas eletroquímicos em sistemas portáteis. Os SPEs podem ser um dos mais adequados sensores eletroquímicos para análise *in situ* por causa da exigência de baixo consumo de energia, resposta rápida, alta sensibilidade, reproduzibilidade e capacidade de operar à temperatura ambiente (Li *et al.*, 2012).

Estes eletrodos são fabricados por meio de um processo denominado "*screen-printing*", ou impressão em tela. A técnica de impressão destes eletrodos usa um molde para apoiar uma matriz de inserção de tinta, em seguida, um rolo ou rodo é movido através da matriz para forçar ou bombear a tinta ou outros materiais de impressão passando-os pelos caminhos gerados pelo molde. Uma impressão pode gerar diversos eletrodos usando um mesmo molde. No intervalo de impressão de duas camadas de tinta sobre um substrato, a tinta primeiramente tem de ser solidificada por meio de um tratamento térmico. Finalmente, um revestimento de tinta de proteção é usado para isolar o caminho condutor dos eletrodos (Li *et al.*, 2012).

Com o intuito de aumentar a condutividade elétrica do SPE, a primeira camada pode ser de uma tinta metálica condutora de Ag, Au, Pt ou outro metal. Neste caso, as camadas sucessivas devem ser posicionadas sobre a trilha metálica para prevenir o contato entre o metal e a solução eletrolítica. Camadas metálicas são também frequentemente utilizadas para imprimir eletrodos de referência e auxiliar conjuntamente com o eletrodo de trabalho para sistemas de três eletrodos (Nascimento e Angnes, 1998).

Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas a um eletrodo inerte através do acoplamento de espécies químicas ativas a sua superfície. Eletrodos modificados podem ser facilmente elaborados uma vez que os inúmeros artifícios utilizados para modificação dos eletrodos de pasta de carbono se adequam aos SPEs. O sensor resultante pode então consistir em várias camadas sucessivas, depositadas sobre o eletrodo base. Os processos de modificação de eletrodo mais comuns envolvem deposição de filme de mercúrio, metais platínicos, complexos metálicos, enzimas, mediadores de elétrons e polímeros. As funções de cada um desses modificadores são muito bem estabelecidas e estudadas em detalhes na literatura (Nascimento e Angnes, 1998).

A modificação de eletrodos tem sido uma área bastante representativa nos anos mais recentes. O uso de nanotubos de carbono tem merecido destaque dentre os modificadores existentes. Na maioria das vezes, a modificação de eletrodos fornece sensibilidade, seletividade,

reprodutibilidade, estabilidade e aplicabilidade superiores àquelas análises utilizando eletrodo convencional sem prévia modificação (Montes, 2015).

O trabalho de Musameh *et al.*, em 2002 deu origem à extensa literatura referente ao uso de eletrodos de carbono vítreo modificados com camadas de nanotubos de carbono e utilizados para estudar o comportamento redox de moléculas de interesse. Neste trabalho, os autores modificaram eletrodo de carbono vítreo, do inglês, “*Glassy-Carbon Electrode*” (GCE) com nanotubos de carbono para a determinação de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo). Foi observado um decréscimo de 490 mV no sobrepotencial de oxidação (começando em -0,05 V vs Ag/AgCl; pH = 7,4) em relação ao eletrodo não modificado. A utilização destes eletrodos modificados foi então analisada por outros pesquisadores (Banks *et al.*, 2005; Banks e Compton, 2006; Wildgoose *et al.*, 2006).

Banks *et al.*, em 2005 exploraram um eletrodo plano de grafite pirolisado modificado com nanotubos de carbono, avaliando a relação entre a estrutura da superfície do eletrodo, (caracterizada por microscopia de imagem por tunelamento) e a transferência de elétrons observada. Banks e Compton, em 2006 mostraram como o uso de eletrodos modificados com nanotubos de carbono levaram a um entendimento fundamental da natureza dos processos de transferência eletrônica em eletrodos de grafite. Wildgoose *et al.*, em 2006 mostraram que existe um grande número de estratégias para a modificação de eletrodos com nanotubos de carbono para uso em eletroanálise e bioeletroanálise.

A cinética mais rápida de um eletrodo modificado é comumente interpretada em termos de eletrocatalise causada pelos nanotubos. Um eletrodo no qual ocorrem processos de cinética rápida é frequentemente avaliado por meio da separação entre os potenciais de pico das ondas direta e reversa em um experimento de voltametria cíclica. No entanto, essa comparação só é válida se o transporte de massa para o eletrodo puro e modificado é o mesmo (Streeter *et al.*, 2008).

Nanotubos de carbono (CNT's) são uma forma alotrópica do carbono, na qual arranjos hexagonais destes átomos com hibridização sp^2 se dispõem ao longo de superfícies cilíndricas nanométricas (Ajayan, 1999). Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT's) são aqueles que possuem mais de uma camada de nanotubos concêntricas, já os que possuem apenas uma camada são conhecidos por nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT's) como pode ser observado na Figura 3 (Thien-Nga *et al.*, 2002). Nos últimos anos, os nanotubos de carbono vêm despertando grande interesse de pesquisadores no mundo por apresentarem extraordinárias propriedades mecânicas, elétricas e térmicas. Estes materiais podem ser

produzidos por diferentes métodos, sendo o mais investigado o processo por Deposição de Vapor Químico (*Chemical Vapor Deposition*, CVD) baseado na decomposição térmica de fontes de carbono gasosas, como CH₄, C₂H₄ ou outras moléculas orgânicas, na superfície de catalisadores metálicos nanoparticulados (Tristão *et al.*).

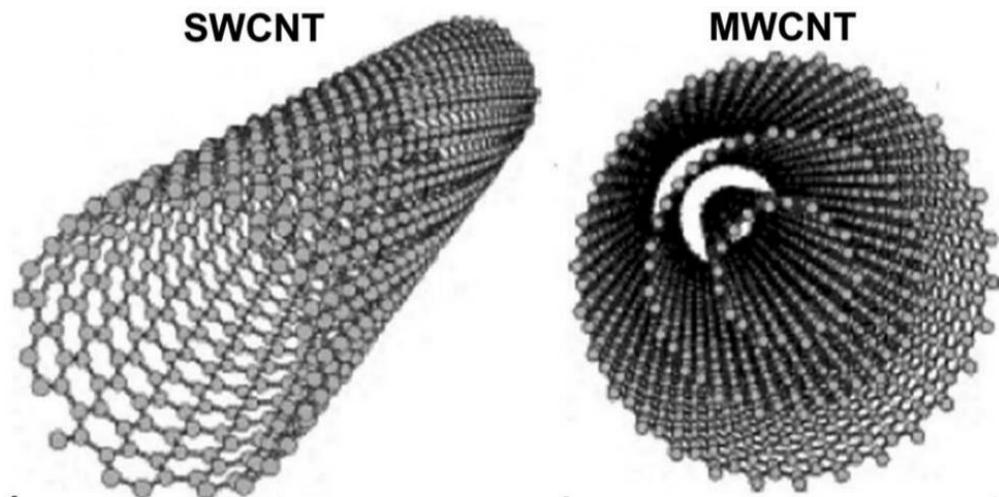


Figura 3 - Estrutura dos nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) e de paredes múltiplas (MWCNT).

Fonte: (Machado *et al.*, 2014).

As propriedades eletrônicas dos MWCNT's são bastante semelhantes aos SWCNT's, pois a interação entre os cilindros é fraca. Através da estrutura eletrônica quase unidimensional, o transporte eletrônico dos SWCNT's e dos MWCNT's se dá ao longo da superfície dos CNT's (Frank *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2001). Os SPE's utilizados neste trabalho foram obtidos já previamente modificados, não sendo necessário realizar nenhum tipo de modificação do mesmo antes da sua utilização.

1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O sistema de análise por injeção em fluxo tem sido utilizado principalmente para a mecanização/automação de análises químicas. Proposto inicialmente por Ruzicka e Hansen, em 1975, estes sistemas tiveram sua proposta inicial a partir de uma criativa combinação de

características de métodos analíticos já existentes, tais como: técnicas eletroquímicas, espectroscopia de absorção atômica, espectrofotometria, fluorescência, quimiluminescência, assim como o aperfeiçoamento do método de análise em fluxo segmentado (De Castro Rodrigues Junior e Saldanha Honorato, 2004). Empregando-se FIA é possível a implementação de todas as etapas envolvidas no processo de análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações, etc.). Entretanto, embora pouco explorados neste sentido, os sistemas de fluxo também apresentam grande potencialidade para a determinação de parâmetros físico-químicos, tais como: coeficiente de difusão, viscosidade, capacidade complexante de ligantes, parâmetros cinéticos e estequimetria de reações (Rocha *et al.*, 2000).

O objetivo inicial na criação do FIA era a obtenção de um sistema no qual fosse possível realizar análises químicas de maneira contínua, de forma que as medidas fossem realizadas de forma rápida e com menor manipulação de amostras. Este sistema consiste na injeção de uma amostra líquida em um fluxo transportador contínuo de solução carregadora. A amostra injetada forma uma zona que posteriormente atravessa uma célula em fluxo, onde um detector medirá continuamente o parâmetro físico desejado (Ruzicka e Hansen, 1975). Resultados reprodutíveis e confiáveis podem ser obtidos em FIA, desde que as condições iniciais (vazão, volume injetado e dimensões do sistema) permaneçam inalteradas até o final do experimento (Silva, 2012). A Figura 4 apresenta o arranjo típico de um sistema FIA de linha única, o qual pode ser subdividido em três partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra e detecção.

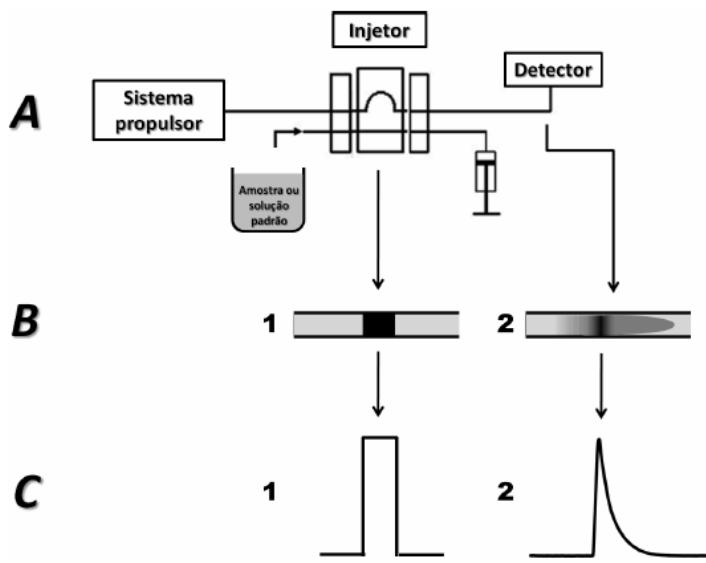


Figura 4 - (A) Disposição dos componentes de um sistema FIA típico de linha única; (B) Esquema do gradiente de concentração das amostras (ou padrões); (C) sinais analíticos obtidos. Fonte: (Silva, 2012).

A propulsão dos fluidos ou sistema propulsor é o responsável pelo transporte da solução carregadora. Bombas pneumáticas, bombas de pistão, propulsão a gás, fluxo gravitacional e bombas peristálticas são alguns sistemas possíveis para movimentar a solução transportadora em uma tubulação (Gimenes, 2013). Por ser mais versátil (vazão constante gerada, controle da vazão por sistemas computadorizados, controle da vazão em várias tubulações simultaneamente, etc.), a bomba peristáltica é o propulsor mais utilizado, no entanto, os pulsos gerados para que ocorra o transporte da solução geram muitos ruídos que são registrados no detector, principalmente nos eletroquímicos. A fim de diminuir ruídos causados pela pulsação da bomba, costuma-se utilizar amortecedores de pulsos (Beinrohr *et al.*, 1993).

O sistema injetor tem função de introduzir um volume definido e reproduzível de uma amostra em um fluxo de reagentes ou de um transportador adequado. O injetor utilizado neste trabalho é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas, e uma alavanca central móvel, que por meio de movimentos para frente e para traz, insere a amostra, que fica retida em um capilar com volume fixo, no percurso analítico. Normalmente, nos sistemas FIA convencionais, volumes injetados são da ordem de 50 a 300 μL (Bergamin F *et al.*, 1978; Zagatto *et al.*, 1978).

Logo após a injeção da amostra em um fluxo transportador, o perfil de concentração é retangular (Figura 4B-1). Conforme a alíquota da amostra flui em direção ao detector, ela se

dispersa através do fluido transportador formando fluxo laminar (Figura 4B-2). O processo de dispersão ocorre como resultado do processo de convecção, ou seja, o fluxo laminar faz com que o centro do fluido se movimente mais rápido do que sua fração próxima às paredes dos tubos. Outro fator é a difusão por concentração, que também provoca alterações no perfil de concentração da alíquota injetada (De Castro Rodrigues Junior e Saldanha Honorato, 2004).

O detector é responsável pela quantificação do analito conduzido pela solução transportadora. Os detectores eletroquímicos apresentam algumas vantagens em relação aos demais, como o baixo custo de implementação, alta sensibilidade e relativa simplicidade (podem ser construídos em laboratório comum). Dentre estes, os detectores amperométricos são bastante utilizados (Felix e Angnes, 2010).

A utilização do sistema de análise por injeção em fluxo adaptada para SPE's simplifica as análises, uma vez que, no lugar de três eletrodos (eletrodos de trabalho, referência e auxiliar), utiliza-se apenas um arranjo, que contenha todos os três eletrodos. Além disso, a utilização de eletrodos impressos proporciona um aumento na reprodutibilidade das análises (Couto, *et al.*, 2016).

Diferentes células FIA adaptadas para o uso de SPEs tem sido propostas e versões comerciais podem ser encontradas na literatura e aplicadas para a análise de amostras farmacêuticas e ambientais (Bergamini *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2010; Mozo *et al.*, 2012; Salgado-Figueroa *et al.*, 2013; Stefano *et al.*, 2014).

Bergamini *et al.* (2007) desenvolveram uma metodologia para a determinação de procaína empregando SPE de carbono sem modificação em um sistema FIA com detecção amperométrica. A oxidação da procaína foi observada em 0,8 V em meio de acetato de sódio (pH = 6). O método descrito forneceu boa precisão (DPR = 3,2 %), limite de detecção de 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e frequência analítica de 36 injeções por hora. Chiu *et al.* (2010) realizaram a determinação de cloridrato de alumínio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 6,0) utilizando o sistema FIA e SPE de prata, no qual o eletrodo de trabalho e contra eletrodo são de prata e um pseudo-referência de Ag/Ag_xO. Neste trabalho também obteve-se valores de precisão satisfatórios (DPR = 2,21 % e 2,16 % para concentrações de 5 e 50 ppm, respectivamente) e um limite de detecção de 295 ppb.

Mozo *et al.* (2012) propuseram a utilização do sistema FIA com SPEs de carbono sem modificação para a determinação de nifuroxazida em fármacos por voltametria de varredura linear com redissolução adsorptiva. O eletrólito empregado foi o tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH = 2,0) e solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Foram obtidos 20 picos por hora. A precisão do método foi

satisfatória ($DPR = 2,5\%$) e baixo limite de detecção (10 ng mL^{-1}) foi obtido. Salgado-Figueroa *et al.* (2013) quantificaram nitrofurantoina em meio aquoso (tampão BR/NaCl 0,1 mol L^{-1}) empregando-se SPE de nanofibras de carbono e sistema FIA com voltametria de varredura linear. O limite de detecção foi de $3,8 \text{ ng mL}^{-1}$. A precisão do método também foi adequada ($DPR = 4,4\%$).

Stefano *et al.* (2014) realizaram a determinação amperométrica simultânea de naproxeno e paracetamol utilizando o sistema FIA e SPE modificado com nanotubos de carbono. Uma alta frequência analítica foi obtida neste trabalho (90 injeções por hora), bem como precisão satisfatória (DPR de 0,4 e 0,3 % para paracetamol e naproxeno, respectivamente). Pode-se observar que a utilização de FIA com eletrodos impressos, modificados ou não, proporcionam bons resultados com precisão satisfatória na determinação de diversos compostos. Esta combinação (FIA-SPE) proporciona, geralmente, altas frequências analíticas, possibilitando uma maior frequência de análises em um espaço de tempo curto.

1.4 Análise por Injeção em Batelada (BIA)

O sistema de análise por injeção em batelada foi desenvolvido por Wang e Taha (Wang e Taha, 1991). O desenvolvimento deste sistema proporcionou uma diminuição na quantidade de soluções utilizada gerando, portanto, menor quantidade de resíduos durante a análise. Uma análise em BIA consiste na injeção de pequenas alíquotas de um analito diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, sendo esta configuração denominada “*wall-jet*”. A injeção da amostra ou dos padrões é realizada com o auxílio de uma micropipeta ou seringa, e fornece sinais transitórios (Figura 5) semelhantes àqueles obtidos em FIA (Wang e Taha, 1991).

Nesta técnica, os eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo), bem como a ponta da micropipeta ficam submersos em um grande volume de solução (inicialmente volumes de 250 a 700 mL (Quintino, 2003), mas atualmente utilizam-se volumes por volta de 180 mL) que proporcionará a diluição do analito ou padrão após obtido o sinal analítico. A magnitude do pico refletirá na concentração de analito injetada.

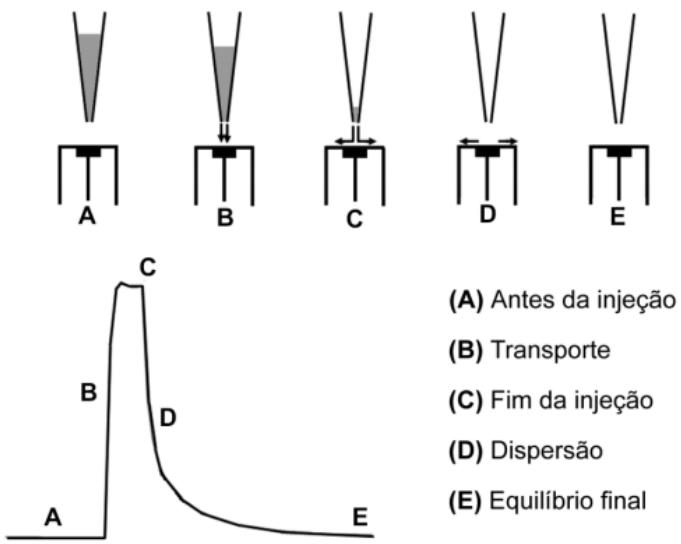


Figura 5 - Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido.

Fonte: (Quintino e Angnes, 2004).

Como pode ser observado na Figura 5, antes da injeção da solução contendo uma espécie eletroativa observa-se uma corrente constante, que é atribuída à corrente residual gerada a partir do eletrólito inerte, indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução (Figura 5A). Quando a solução padrão ou amostra é injetada, há um rápido aumento da corrente, devido ao processo de oxidação ou redução que ocorre com o analito de interesse transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção (Figura 5B). Enquanto a injeção do analito ainda ocorre, a corrente atinge um valor máximo permanecendo constante até o final da injeção (Figura 5C). Após o fim do procedimento de injeção há uma queda acentuada do sinal analítico devido à mudança do transporte que passa de convectivo para difusional (há agora uma maior concentração de espécies oxidadas/reduzidas que tendem a se difundir para o seio da solução) (Figura 5D), atingindo, portanto, o equilíbrio existente antes da injeção (corrente residual; Figura 5E) (Quintino e Angnes, 2004).

O retorno da corrente ao patamar inicial de injeção pode ser acelerado através de uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula (Pereira *et al.*, 2013). O procedimento BIA possui diversas características similares àquelas apresentadas por sistemas FIA, como: rapidez, simplicidade, boa repetibilidade e sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes. Além disso, como em sistemas FIA, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho também é

menor em relação aos sistemas estacionários devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante a análise. Apesar disso, os sistemas BIA têm sido pouco explorados até hoje, se comparados aos sistemas FIA.

O sistema BIA pode ser considerado um análogo do FIA, com características especiais como a eliminação de tubos, bombas, válvulas para injeção de amostra, os quais são sempre substituídos pelo uso de uma micropipeta eletrônica adaptada a uma célula eletroquímica em uma configuração “wall-jet” em relação ao eletrodo de trabalho (Wang e Taha, 1991; Quintino e Angnes, 2004). Seringas ou micropipetas manuais podem também ser usadas no lugar das eletrônicas com a introdução de um padrão interno como demonstrado na literatura (Gimenes *et al.*, 2010; Gimenes *et al.*, 2012).

Devido à pequena distância existente entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho, os sistemas BIA apresentam restrições em procedimentos de derivatização e pré-tratamentos ou diluições online de amostras. Além disto, as possibilidades de automação são limitadas. Apesar das características interessantes que os sistemas BIA apresentam, um pequeno número de trabalhos empregando estes sistemas foram descritos na literatura até hoje (Quintino, 2003), provavelmente, devido à necessidade do uso de pipetas eletrônicas para obtenção de reproduzibilidade no processo de injeção. Estas pipetas geralmente não estão disponíveis nos laboratórios comuns de pesquisa, e no uso de pipetas manuais, a repetibilidade do sistema é diretamente dependente da habilidade do operador. Além disto, problemas relacionados com os fenômenos de adsorção irreversíveis (contaminação) quando eletrodos sólidos são usados também podem ser contornados mediante uso de padrão interno (Silva, 2012) ou fazendo-se aplicação de amperometria de múltiplos pulsos, empregando-se potencial para limpeza do eletrodo (Stefano *et al.*, 2012).

Recentemente, a associação de SPEs com análises por injeção em batelada (BIA), a qual permite análise altamente precisa e portátil por meio do uso de micropipetas eletrônicas que dispensa micro volumes de amostras ou soluções padrão em velocidades controladas sobre o eletrodo de trabalho tem sido propostas. O sistema analítico completamente portátil chamado BIA-SPE foi demonstrado para a análise de amostras biológicas e combustíveis (Tormin *et al.*, 2014).

Ferreira *et al.* (2012) fizeram a determinação de ciclopirox em amostras farmacêuticas empregando-se eletrodo de carbono vítreo com detecção amperométrica acoplada tanto ao sistema FIA quanto ao BIA. As análises em BIA proporcionaram uma maior sensibilidade ($0,091 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1}$) do que no FIA ($0,022 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1}$) e menor limite de detecção ($0,147 \mu\text{mol}$

L^{-1}) do que aquele obtido por FIA ($0,593 \mu\text{mol L}^{-1}$). Segundo os autores, isto ocorre devido à maior velocidade de injeção do BIA com relação a FIA. Uma maior frequência analítica (735 injeções por hora - sem considerar o tempo necessário para preenchimento da pipeta com solução, ou seja, uma frequência analítica teórica) do que observada no sistema FIA (330 injeções por hora) foi obtida. As faixa lineares de trabalho obtidas nos sistemas FIA e BIA foram a mesma: 2,0 a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. A precisão dos métodos foi também comparada, em FIA os valores de DPR foram de 2,1 e 4,3 % para injeção de soluções de 100 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ciclopirox, respectivamente. Para o sistema BIA, os valores de DPR foram 1,8 e 4,8 % para soluções de 100 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ciclopirox, respectivamente. Para os autores, ambos os métodos são potenciais para a determinação de ciclopirox em amostras farmacêuticas, pois forneceram uma boa precisão e exatidão, além da necessidade de pequenos volumes de amostra em cada análise.

1.5 Técnicas Eletroanalíticas

A eletroquímica nasceu de uma união entre a bioquímica e a eletricidade, e é essencial entre as ciências químicas necessárias para preparar a sociedade para um futuro próximo (Bockris *et al.*, 2002). A utilização de medidas elétricas na química analítica possui uma vasta gama de aplicações, incluindo monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial, e análises biomédicas. Avanços nas décadas de 80 e 90, como o surgimento de ultramicroeletrodos, o desenvolvimento de interfaces adaptadas e monocamadas moleculares, o desenvolvimento de técnicas voltamétricas que detectam ultra-traço dentre outros levaram a um aumento substancial na popularidade das técnicas eletroanalíticas e, consequentemente, proporcionou seu desenvolvimento (Wang, 2006).

O controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas é dominado por técnicas cromatográficas, principalmente pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção no ultravioleta, uma vez que estas técnicas permitem o desenvolvimento de métodos altamente robustos e seletivos, sendo estes parâmetros analíticos extremamente importantes em uma análise. Os métodos cromatográficos, porém, apesar das vantagens descritas anteriormente, apresentam diversos inconvenientes frente a outras ferramentas analíticas, tais como: elevado custo na aquisição dos equipamentos e serviços de manutenção, utilização de reagentes de alto custo onerando as análises de rotina, baixa frequência analítica devido aos tediosos e recorrentes tratamentos de amostras e longos tempos de retenção, complexidade de

operação requerendo mão-de-obra altamente capacitada, além da elevada geração de resíduos devido à utilização de solventes orgânicos na fase móvel, exigindo controle mais complexo e dispendioso dos efluentes das empresas para que não haja impacto ambiental pelo setor analítico.

As técnicas eletroanalíticas fornecem informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias como características de processos de oxidação e redução em vários meios, adsorção de um composto em superfícies e até mesmo mecanismo de transferência de elétrons, sendo possível realizar a quantificação de espécies com alta sensibilidade.

Desta forma, as técnicas eletroanalíticas surgem como uma alternativa para a determinação de fármacos, pois além de simples, de baixo custo, e serem análises que possuem grande sensibilidade, seletividade e baixos limites de detecção, elas oferecem a possibilidade de se determinar a concentração do composto de interesse diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações prévias (Skoog, 1998).

O desenvolvimento da instrumentação eletroanalítica desencadeou o crescimento da utilização de técnicas de detecção eletroquímicas, tais como: a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada, a voltametria de pulso diferencial e a amperometria, com as quais é possível a aquisição de dados com sensibilidade comparável à obtida com o emprego de técnicas cromatográficas de separação com detecção espectrofotométrica (Skoog, 1998).

1.5.1 Voltametria Cíclica (VC)

De todos os métodos disponíveis para o estudo de processos de eletrodo, métodos de varredura de potencial são provavelmente os mais amplamente utilizados, especialmente por não eletroquímicos. Eles consistem na aplicação de uma forma contínua de potencial no eletrodo de trabalho variando com o tempo. Este processo resulta na ocorrência de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas em solução (processos faradaicos), possivelmente devido à adsorção de espécies de acordo com o potencial aplicado, e uma corrente capacitiva devido ao carregamento da dupla camada elétrica. A corrente observada é, portanto, diferente do que no estado estacionário (Brett e Brett, 1996).

A técnica de varredura de potencial é normalmente usada em eletrodos estacionários mas também pode ser utilizada em eletrodos hidrodinâmicos. Seu principal uso tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas para a identificação das espécies presentes na solução e para análises semi quantitativas de velocidade de reação (Brett e Brett, 1996).

O perfil de corrente elétrica em função do potencial do registro da corrente elétrica, associada à variação de potencial denomina-se voltamograma (Figura 6). Embora a VC não seja utilizada com frequência para a determinação quantitativa, é uma técnica que deve ser escolhida, quando se inicia o estudo de um sistema desconhecido, isto é, para se estudar eletroquimicamente um composto pela primeira vez. A partir do voltamograma traçado, facilmente se obtém informações quanto aos potenciais em que ocorrem os processos de transferência de elétrons, para o estudo da reversibilidade das reações redox, na detecção de intermediários de reação e nos estudos de produtos formados no decorrer de uma reação (Nicholson e Shain, 1964; Skoog, 1998).

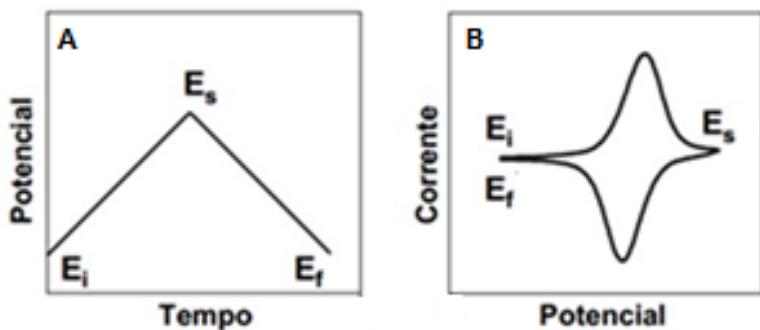


Figura 6 - Curvas obtidas por voltametria cíclica: (A) Esquema de varredura de potencial *vs* tempo; (B) Voltamograma da corrente obtida em função do potencial. E_i : potencial inicial; E_s : potencial de inversão; E_f : potencial final.

Fonte: (Quintino, 2003).

Durante um experimento de VC, a resposta de corrente de um eletrodo estacionário em uma solução mantida em repouso é excitada na forma de uma onda triangular (Figura 6A). A onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso. Normalmente o ciclo é repetido diversas vezes. Os potenciais nos quais a reversão do sentido de varredura ocorre são chamados potenciais de inversão. Para um dado experimento, os potenciais de inversão são escolhidos de maneira que possamos observar a oxidação ou redução, de uma ou mais espécies. A direção da varredura inicial pode tanto ser negativa, quanto positiva, dependendo da composição da amostra. A Figura 6B fornece a resposta de corrente, sendo os valores máximos de pico correspondentes à oxidação ou redução de um analito (Skoog, 1998).

1.5.2 Amperometria (AMP)

Um sensor amperométrico mede uma corrente *vs.* tempo, a um potencial aplicado fixo, isto é, para um ponto na curva de corrente versus potencial. Um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente versus potencial. Portanto um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico para um potencial fixo (Brett e Brett, 1996).

Na amperometria convencional, o eletrodo de trabalho é normalmente mantido em um potencial constante adequado, no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse. Esses detectores apresentam maior sensibilidade, sendo que a medição de correntes baixíssimas (e, portanto de baixas concentrações) está associada à virtual ausência de corrente capacitativa e menor efeito na contaminação da superfície do eletrodo de trabalho devido ao menor tempo de contato da amostra e dos produtos do processo de oxidação/redução com o eletrodo (comparando aos processos estacionários) (Brett e Brett, 1996). Com isso, uma maior estabilidade na resposta do detector pode ser alcançada, proporcionando alta reprodutibilidade nos resultados obtidos. Quando associada a métodos de análise de alta velocidade, tais como FIA e BIA esta técnica torna-se ainda mais atrativa.

Esta técnica possui, no entanto, alguns problemas relacionados com processos adsorptivos de alguns analitos na superfície do eletrodo durante as análises. A contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, como também pode produzir sinal eletroquímico devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal desejado. Diversas estratégias são apresentadas na literatura para promover a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho, ou impedir sua contaminação ou passivação tais como adição de EDTA ao eletrólito suporte (De Carvalho *et al.*, 2004), o uso de eletrodos modificados (Pedrosa *et al.*, 2006; Haghghi *et al.*, 2007), ou regeneração da superfície constantemente (Catarino *et al.*, 2003), ou ainda o uso da amperometria pulsada para limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho (Stefano *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é demonstrar o uso de SPEs empregando dois sistemas de análise (BIA e FIA) com detecção amperométrica, na determinação e quantificação de ciprofloxacina em amostras farmacêuticas, incluindo a comparação dos dois métodos entre si e com outras metodologias descritas na literatura.

Basicamente o trabalho foi dividido em duas partes:

1. Emprego da Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica e célula adaptada para o uso de eletrodos impressos de carbono para a determinação de ciprofloxacina;
2. Emprego da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção amperométrica e célula adaptada para o uso de eletrodos impressos de carbono para a determinação de ciprofloxacina.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As medidas eletroquímicas envolvendo ciprofloxacina foram realizadas usando um bipotenciómetro portátil DropSens μ STAT200 (DropSens, Oviedo, Espanha) equipado com um cabo conector (modelo BICAST) para conectar o eletrodo impresso eletronicamente ao bipotenciómetro. Um notebook com o software DropView 2.0 para Windows XP[®] foi usado para controlar o instrumento. Utilizou-se também um potenciómetro μ -Autolab Tipo III (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), controlado pelo software NOVA (versão 1.11).

Todos os experimentos foram realizados usando eletrodos impressos (SPEs) comerciais, os quais consistem em um arranjo contendo os três eletrodos depositados em uma mesma placa de cerâmica de alumina (DRP-110CNT, da DropSens). A placa (de dimensões $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm) apresenta um disco de 4 mm de diâmetro (área geométrica) de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT-SPE) depositado no seu centro como eletrodo de trabalho (WE), um contra eletrodo (CE) de carbono e um eletrodo pseudo-referência de prata como eletrodo de referência (RE). Para comparação, eletrodos impressos de carbono sem modificação (C-SPE) também foram estudados.

3.2 Reagentes e Soluções

Para o preparo das soluções foi utilizada água desionizada do sistema de purificação Milli-Q Plus da Millipore (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) (Bedford, MA, EUA), sendo que todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico. Ácido clorídrico e cloreto de metileno grau analítico, laurilsulfato de sódio, carbonato de cálcio, obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico (85% m/v) da Impex (São Paulo, Brasil), ácido oxálico da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), ácido bórico da QM (Cotia, Brasil), ácido acético glacial de Carlo Erba (Milan, Itália), hidróxido de sódio e etanol da Dinamica (Diadema, Brasil), acetonitrila (grau HPLC) da Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil), amido, hidroxipropilmetilcelulose, estearato de magnésio e dióxido de titânio da Synth (Diadema, Brasil) e hidróxido de lítio, trietanolamina, ciprofloxacina (CFX) proveniente da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

A solução estoque de CFX foi preparada antes da realização dos experimentos por meio de simples diluição em eletrólito. O tampão Britton-Robinson (BR) que foi nos estudos

voltamétricos e amperométricos é composto de uma mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), e os diferentes pHs foram ajustados com hidróxido de sódio. Uma solução tampão ($\text{pH} = 8,5$) contendo ácido oxálico $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e trietanolamina 12 mmol L^{-1} foi usada como tampão de corrida nas análises de eletroforese capilar (CE). As amostras farmacêuticas foram obtidas em drogarias locais.

Os comprimidos de ciprofloxacina (500 mg) contém amido, estearato de magnésio, dióxido de titânio e hidroxipropilmetilcelulose como excipientes majoritários. A amostra líquida é destinada a uso veterinário (para injeção) e contém 10 g de ciprofloxacina por 100 mL de solução. O fabricante não informa quais os excipientes compõem a amostra. Para cada análise de formulações farmacêuticas, dois comprimidos de mesma marca foram pulverizados em almofariz (massa aproximada de 800 mg por comprimido). Uma quantidade adequada (5,28 mg) da amostra pulverizada foi dissolvida (em banho ultrassônico por 10 min) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A amostra líquida (33 mL) foi diretamente diluída em eletrólito (10 mL). Ambas amostras foram previamente diluídas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para subsequente injeção nos sistemas BIA e FIA ou em água se injetado no sistema CE-C⁴D. Os testes de recuperação para a determinação de ciprofloxacina pelos sistemas BIA e FIA foram realizados pela adição de solução padrão contendo $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ciprofloxacina dentro de um frasco volumétrico no qual a amostra (sólida ou líquida) foi dissolvida.

3.3 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e na presença de oxigênio dissolvido. Para observar o comportamento eletroquímico do eletrólito suporte nos SPEs foram realizadas voltametrias cíclicas ($n = 3$) em uma faixa de 0,0 a 1,2 V antes de todas as medidas eletroquímicas.

As medidas em voltametria cíclica foram realizadas em uma faixa de 0,0 a 1,2 V (velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}) em diferentes eletrólitos. As medidas amperométricas foram realizadas aplicando-se um potencial em associação com os sistemas BIA e FIA.

3.3.1 Sistema BIA

Uma célula BIA, desenvolvida pelos pesquisadores do grupo (Figura 7), consiste em um cilindro de polipropileno de 100 mL (diâmetro interno de 8 cm e comprimento de 6 cm) e uma tampa também de polipropileno firmemente encaixada no topo do cilindro, com um orifício central (4 mm de diâmetro) para a inserção da ponteira da micropipeta eletrônica (diâmetro externo de 3,7 mm), a qual é posicionada em uma configuração “wall-jet” (em oposição) à superfície do eletrodo de trabalho (Tormin *et al.*, 2014).

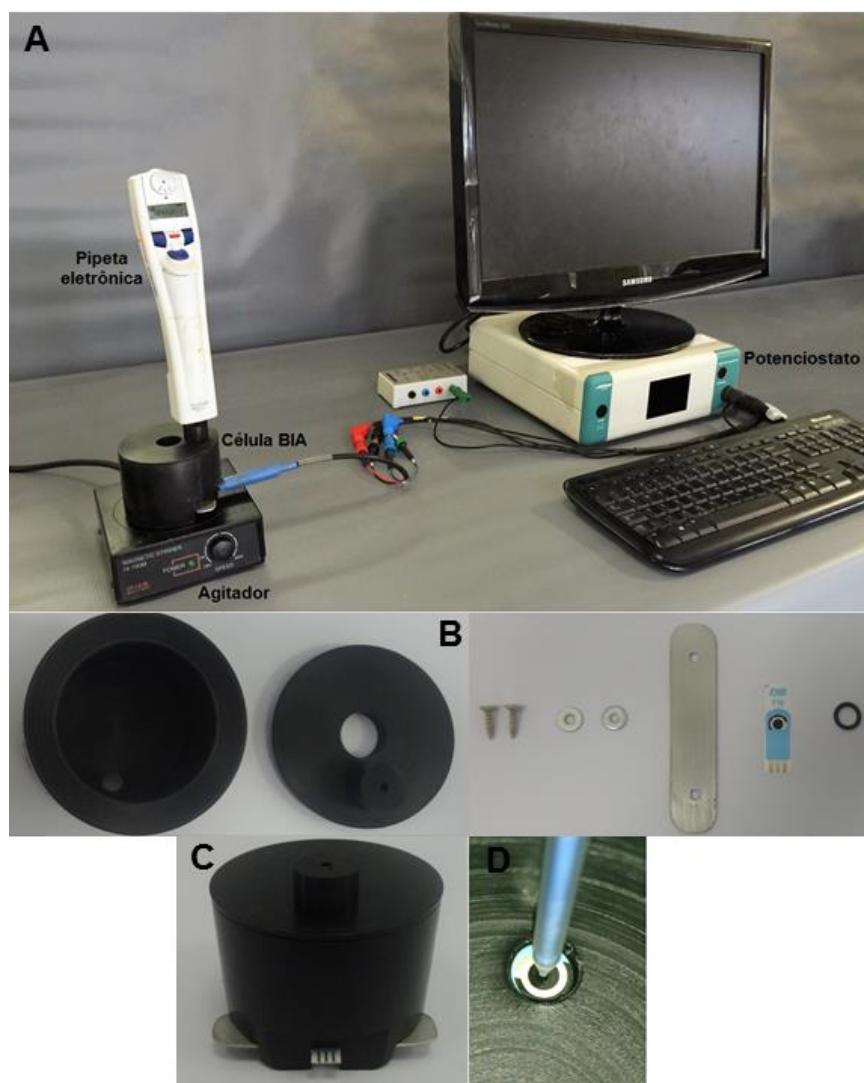


Figura 7 - Imagem do sistema BIA utilizado nas análises, no qual: (A) Sistema completo, (B) Célula BIA aberta com todos seus componentes, (C) Célula BIA fechada e (D) SPE inserido na célula com a ponta da micropipeta eletrônica em configuração wall-jet.

O SPE é posicionado na lateral inferior da célula com o auxílio de um O-ring similarmente às células FIA descritas na literatura (Hsu *et al.*, 2006; Henríquez *et al.*, 2012). O O-ring (0,8 cm de diâmetro) limita a região dos três eletrodos (WE, CE e pseudo-RE) em contato com o eletrólito e previne vazamentos do mesmo. Injeções de soluções padrão ou amostras diluídas foram realizadas usando uma micropipeta eletrônica Eppendorf (Multipette stream), a qual permite injeções de 10 a 200 μL (usando uma ponteira do tipo Combitip® de 200 μL) em uma velocidade de dispensa programável (de 28 a 350 $\mu\text{L s}^{-1}$). Foi empregado sistema de agitação inserindo-se uma barra de agitação dentro da célula BIA, além de um agitador magnético (Hanna Instruments, modelo HI 190M).

3.3.2 Sistema FIA

Um sistema FIA de linha única foi empregado e montado em laboratório para a análise empregando-se detecção amperométrica em fluxo. O sistema FIA consiste na injeção de uma amostra líquida em um fluxo contínuo de eletrólito suporte. Sistemas de análise em fluxo têm sido utilizados principalmente para a mecanização/automação de análises químicas, com o emprego destes sistemas, é possível a implementação de todas as etapas envolvidas no processo de análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações, etc.) (De Castro Rodrigues Junior e Saldanha Honorato, 2004). Os componentes básicos deste sistema são apresentados na Figura 8.

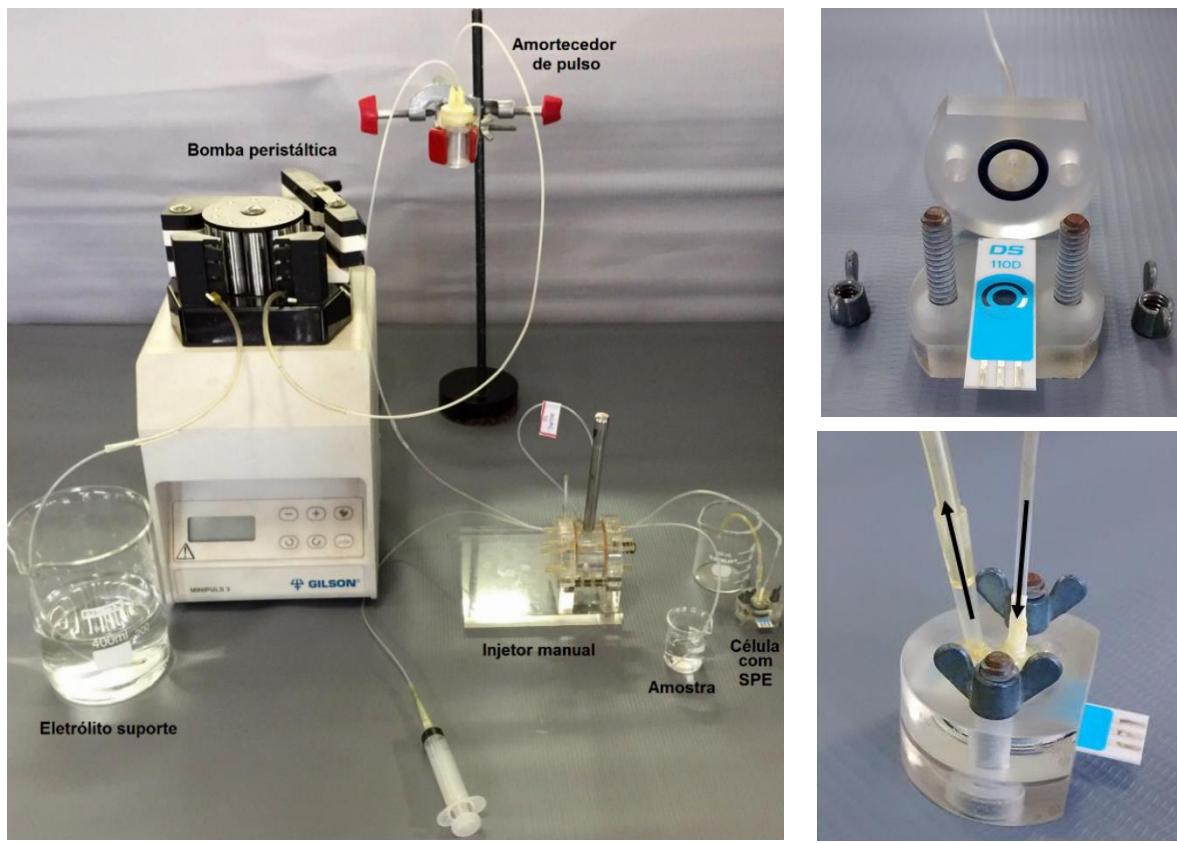


Figura 8 - Imagem do sistema FIA utilizado nas análises (à esquerda) e foto da célula adaptada para SPEs ampliada aberta e fechada, onde (↓) representa a entrada do fluxo e (↑) representa a saída do fluxo.

Fonte: a autora.

Uma célula em fluxo (construída em laboratório pelo nosso grupo de pesquisa) foi feita para adaptar SPEs ao sistema FIA com detecção amperométrica (Stefano *et al.*, 2014) (Figura 8). O eletrodo é firmemente posicionado entre dois blocos de acrílico (a parte inferior possui uma pequena saliência para encaixe do eletrodo). Um O-ring de 10 mm de diâmetro é usado para delimitar o volume interno ($\approx 90 \mu\text{L}$) cobrindo os três eletrodos. O bloco superior contém dois buracos que permitem a entrada (a 90° em configuração wall-jet) e saída (a 45°) da solução. O fluxo da célula eletroquímica é conectado a uma bomba peristáltica e a um injetor manual. Um sistema de fluxo de linha única foi empregado usando um tubo de polietileno de 1,0 mm de diâmetro interno.

3.3.3 Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato

Para comparação dos resultados obtidos para a ciprofloxacina empregou-se eletroforese capilar (CE) usando-se um equipamento desenvolvido em laboratório (Francisco e Do Lago, 2009) com dois detectores condutométricos sem contato de alta resolução acoplados capacitivamente (CE-C⁴D) como descrito na literatura (Montes *et al.*, 2014). O capilar de sílica fundida foi de 40 cm de comprimento (comprimentos efetivos de 10 e 30 cm) e 50 µm de diâmetro interno por 375 µm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, Califórnia, Estados Unidos). A ciprofloxacina foi medida usando apenas o primeiro detector. Antes das análises, o capilar foi enxaguado com água desionizada por 10 minutos, em seguida com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 15 minutos, água desionizada novamente por mais 10 minutos e por fim solução do eletrólito de corrida por 10 minutos. As amostras foram injetadas por 0,5 s aplicando-se 25 kPa e o potencial de separação foi de 25 kV.

Um programa de computador desenvolvido em ambiente LabView 8 (National Instruments, Austin, TX) é responsável pelo controle do equipamento e aquisição dos dados. O instrumento é equipado com uma fonte de alta tensão bipolar (Spellman Power Supply 30 Kv).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo da Área Eletroativa do Eletrodo

A área ativa de um eletrodo geralmente é diferente da área geométrica, sendo que a área geométrica é maior na maioria das vezes, isto ocorre porque nem toda a superfície de um eletrodo é composta por áreas eletroativas, responsáveis pela transferência eletrônica que ocorre na superfície do eletrodo. Considerando-se que a modificação da superfície de um eletrodo aumenta o número de rugosidades na superfície do mesmo, poderá ocorrer um aumento na taxa de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução aumentando, consequentemente, a área ativa do eletrodo. Desta forma, um eletrodo modificado apresenta geralmente, melhor desempenho do que aqueles que não possuem modificações (Montes, 2015).

A área ativa do eletrodo foi analisada utilizando a técnica de voltametria cíclica e a equação de Randles-Sevcik, a qual mostra que em sistemas reversíveis com transferência de massa controlada por difusão existe uma relação entre a corrente de pico e a área ativa do eletrodo. Essa área pode ser obtida a partir da equação de Randles-Sevcik (Bard, 1980; Skoog, 1998) desde que conhecidos o número de elétrons, coeficiente de difusão e concentração da espécie eletroativa, velocidade de varredura do potencial e corrente de pico a uma dada temperatura. O processo de transferência de carga com o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, que possui comportamento eletroquímico bem conhecido, foi utilizado para essa análise de área efetiva do eletrodo. Portanto, para o cálculo da área ativa, utilizou-se a relação de Randles-Sevcik, apresentada na Equação 1:

$$A = \frac{ip}{v^{1/2}} \times \frac{1}{2,686 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot C_0} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A = Área ativa do eletrodo (cm^2);

ip = Corrente de pico (Ampére);

v = Velocidade de varredura (V s^{-1});

n = Número de elétrons envolvidos na reação redox (constante adimensional);

D = Coeficiente de difusão da espécie eletrolítica ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$);

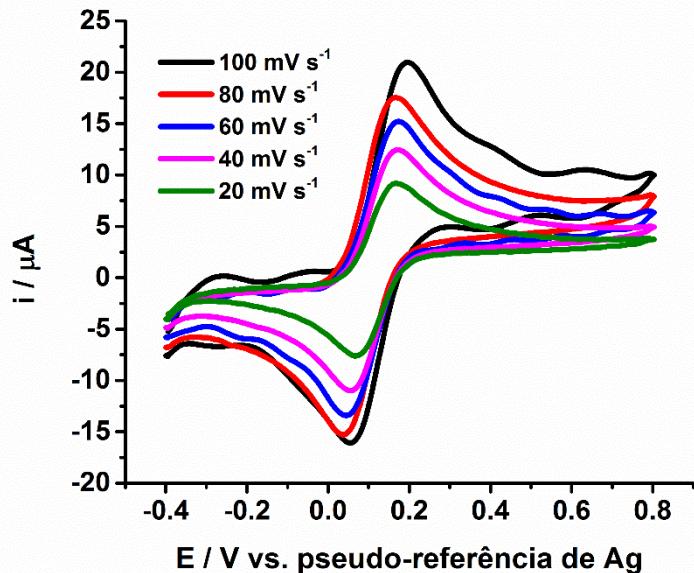
C_0 = Concentração das espécies reduzidas ou oxidadas (mol cm^{-3}).

Rearranjando-se a Equação 1, tem-se:

$$i_p = 2,687 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C_0 v^{1/2}$$

Esta equação possui comportamento linear, ou seja, o de uma reta passando pela origem e com coeficiente angular dado pela expressão ($2,687 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C^*$). Para o sistema $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ as variáveis são: $n = 1$, $C_0 = 1 \times 10^{-6}$ mol cm^{-3} , e o coeficiente de difusão do ferrocianeto de potássio em meio de KCl $0,1 \times 10^{-3}$ mol cm^{-3} , que é igual a $6,39 \times 10^{-6}$ $cm^2 s^{-1}$ (Zoski, 2007). Foram realizados voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (20, 40, 60, 80 e 100 $mV s^{-1}$) para o eletrodo impresso utilizado neste trabalho (MWCNT-SPE) como pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos em MWCNT-SPE para o sistema redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, realizado em solução de $0,1$ mol L^{-1} KCl / 1×10^{-3} mol L^{-1} $K_4[Fe(CN)]_6$. Velocidades de varredura: 20, 40, 60, 80 e 100 mV s^{-1} .



Desenvolvendo-se as equações, chegou-se a um valor de área ativa para o eletrodo utilizado, MWCNT-SPE, de $7,7\text{ mm}^2$. Como previsto, a área do eletrodo impresso modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas é maior do que aquela obtida por eletrodo impresso de carbono sem modificação, que possui área média de $6,3\text{ mm}^2$ como pode ser

observado na literatura (Stefano *et al.*, 2014), o que corresponde a um aumento de 22 % na área ativa do eletrodo quando modificado. Para um eletrodo de carbono vítreo puro (sem modificações) foi observada aproximadamente a mesma relação, a área ativa calculada foi de 4,7 mm² para a superfície limpa, porém, após modificação com nanotubos de carbono, a área do eletrodo aumentou para 5,7 mm² (Montes, 2015), um aumento de 21 %. Desta forma, novos testes foram realizados utilizando-se o eletrodo modificado.

4.2 Determinação de Ciprofloxacina

Para a determinação da ciprofloxacina (CFX) inicialmente foi necessário realizar-se um estudo para observação do comportamento eletroquímico deste analito em diferentes eletrodos para que se dê a escolha do melhor eletrodo para a realização deste trabalho. Este estudo de comportamento eletroquímico é feito empregando-se voltametria cíclica em diferentes eletrodos (Figura 10). A oxidação eletroquímica da CFX foi investigada usando voltametria cíclica em uma janela de potenciais que varia de 0,0 a 1,2 V a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ em diferentes eletrodos: eletrodo de carbono vítreo sem modificação (GCE), eletrodo impresso de carbono sem modificação (C-SPE) e em eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT-SPE), como pode ser visto na Figura 10.

O eletrólito empregado foi o tampão Britton-Robinson (BR) em pH 4,0 com base em estudos relatados na literatura (Zhang e Wei, 2007), no qual emprega-se este pH para a realização de voltamogramas cíclicos para o mesmo analito, utilizando-se eletrodo de pasta de carbono. Posteriormente, variou-se os valores pH de trabalho para otimização e aplicação neste trabalho. O tampão BR foi empregado devido à sua ampla capacidade tamponante, sendo possível variação de pHs numa faixa de 2 a 12 (Britton e Robinson, 1931).

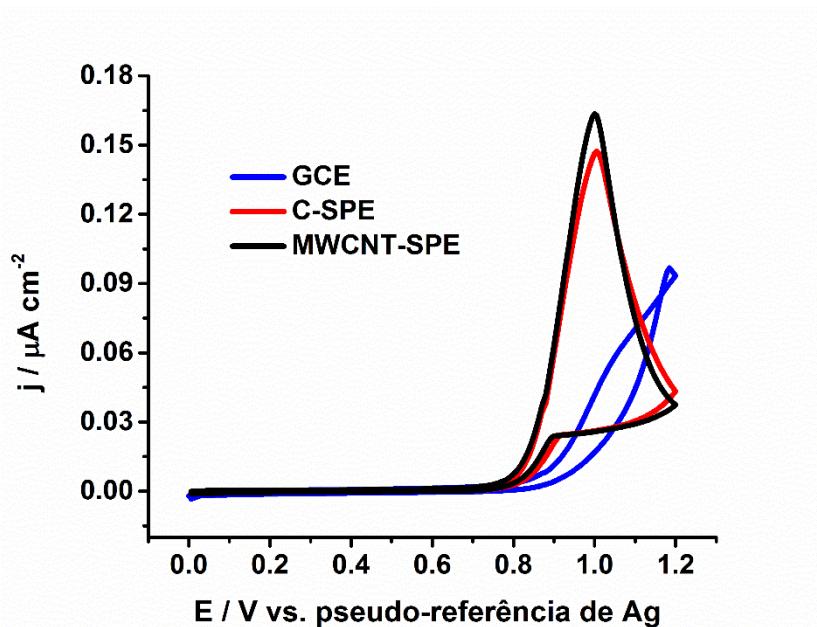


Figura 10 - Voltamogramas cíclicos de 1 mmol L⁻¹ de CFX em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) em diferentes eletrodos (GCE vs. Ag/AgCl em KCl saturado, C-SPE e MWCNT-SPE). Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

A corrente obtida para CFX nos SPE's foi de 6 a 7 vezes maior quando comparada àquela obtida no carbono vítreo. Mesmo considerando a diferença nas áreas eletroativas dos eletrodos, (o eletrodo de carbono vítreo sem modificações possui área eletroativa de 4,7 mm², o C-SPE possui área eletroativa de 6,3 mm² e o MWCNT-SPE de 7,7 mm²), o aumento do valor de corrente proporcionado pelos SPE's ainda é aproximadamente 4 vezes maior do que o valor de corrente obtido em eletrodo de carbono vítreo sem modificações, atestando a melhora no sinal analítico proporcionada por estes eletrodos.

A presença da funcionalização com MWCNTs no SPE não revelou antecipação do potencial de oxidação como seria esperado devido às propriedades eletrocatalíticas dos nanotubos de carbono (Ji *et al.*, 2010). No entanto, o MWCNT-SPE forneceu maior resposta eletroquímica (aumento em quase 10%) e por essa razão este eletrodo foi selecionado para posteriores estudos voltamétricos. Como pode ser observado, um pico de oxidação foi obtido em 1,0 V com início em 0,8 V. Não foram observados pico de redução na varredura reversa, o que indica a existência de irreversibilidade do processo de oxidação. Um possível produto da oxidação da ciprofloxacina pode ser visto na Figura 11 (Fotouhi e Alahyari, 2010).

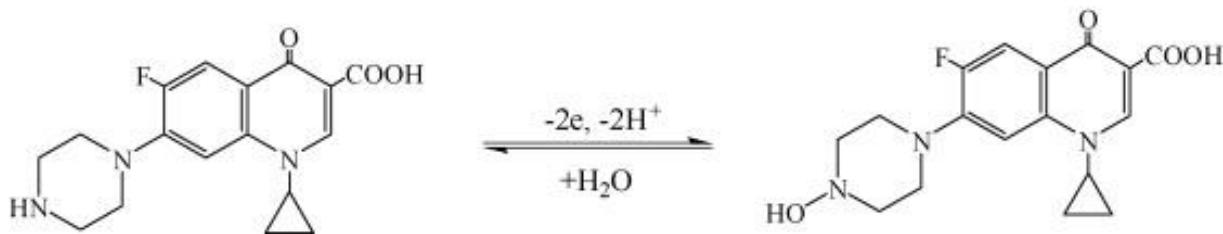


Figura 11 - Processo de oxidação eletroquímica resumido para a ciprofloxacina.

Fonte: (Fotouhi e Alahyari, 2010).

Após escolha do eletrodo, realizou-se um estudo para a escolha do melhor pH de trabalho. A Figura 12 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos alterando-se o pH de uma solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0; 3,0; 4,0 e 10,0) empregando-se eletrodo MWCNT-SPE. A solubilidade da CFX é dependente do pH do meio. CFX é solúvel em soluções de pH abaixo de 5 e maiores que 9, desta forma, o estudo de pH se deu em 2, 3, 4 e 10 para a investigação da oxidação eletroquímica deste analito.

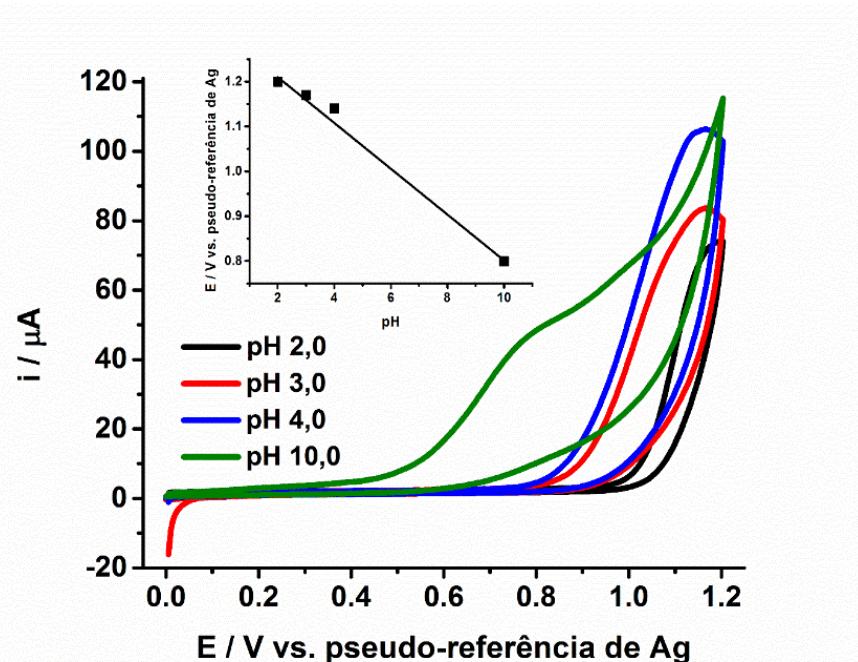


Figura 12 - Voltamogramas cíclicos de CFX 1 mmol L⁻¹ em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH obtidos em MWCNT-SPE. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. A curva de calibração inserida corresponde ao plot de E versus pH.

Como pode ser observado pela Figura 12, a solução tampão BR em pH 4,0 forneceu maior resposta eletroquímica na oxidação de CFX, desta forma, este foi o eletrólito selecionado

para os próximos estudos amperométricos usando MWCNT-SPE. A curva de calibração inserida na Figura 12 apresenta coeficiente angular de 51 mV (em módulo) por unidade de pH, valor este próximo ao valor teórico (59 mV) e indica que o mesmo número de prótons e elétrons está envolvido no processo de oxidação de CFX, confirmando o que foi observado no mecanismo resumido de oxidação para este composto (Figura 12).

Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores que propõe o mecanismo eletroquímico de oxidação de CFX (Fotouhi e Alahyari, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Os parâmetros necessários para a determinação amperométrica de CFX usando os sistemas FIA e BIA foram otimizados, seguido de análises de formulações farmacêuticas e comparação com os resultados obtidos por CE.

4.2.1 Análise por FIA com detecção amperométrica

Um voltamograma hidrodinâmico para CFX foi obtido com base em medidas amperométricas obtidas pelo sistema FIA (Figura 13). Este estudo compara a corrente de oxidação obtida em dois diferentes eletrodos (C-SPE e MWCNT-SPE) empregando-se tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em pH 4,0 como eletrólito suporte para ambos os eletrodos.

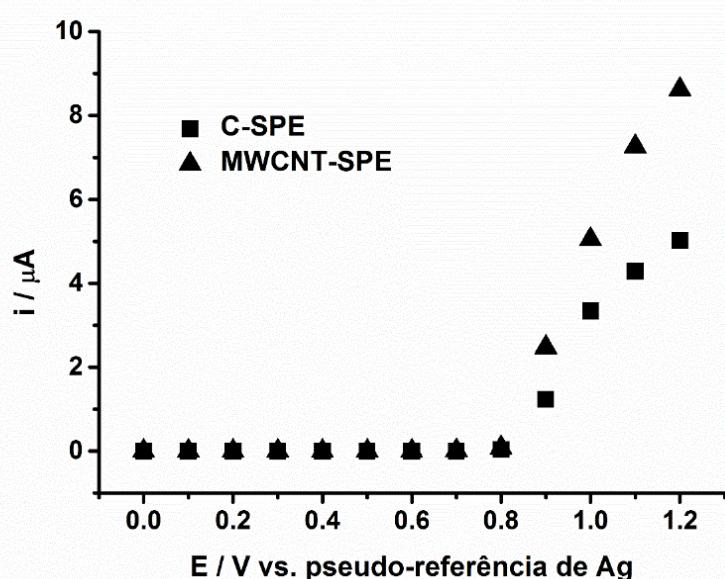


Figura 13 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando-se os valores de corrente de pico (média de 3 injeções) para CFX 50 μmol L⁻¹ em função dos potenciais aplicados no sistema FIA. Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0; Eletrodos: MWCNT-SPE e C-SPE.

Um aumento na corrente de oxidação para CFX foi observado em potenciais maiores que +0,8 V em ambos eletrodos. Na região entre +0,9 e +1,2 V, as respostas de corrente obtidas em MWCNT-SPE foram maiores do que aquelas obtidas por C-SPE. O eletrodo de trabalho modificado com MWCNTs apresentou maiores correntes como também foi observado nos estudos de voltametria cíclica. O potencial selecionado para posteriores experimentos foi de +1,0 V para não comprometer a seletividade e estabilidade (contaminação do eletrodo) do sensor.

Os parâmetros do sistema FIA foram avaliados de forma a obter-se maiores sinais de corrente para CFX. A Figura 14 apresenta o efeito de volume injetado (A) e vazão (B) na corrente de oxidação da CFX em eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNTs.

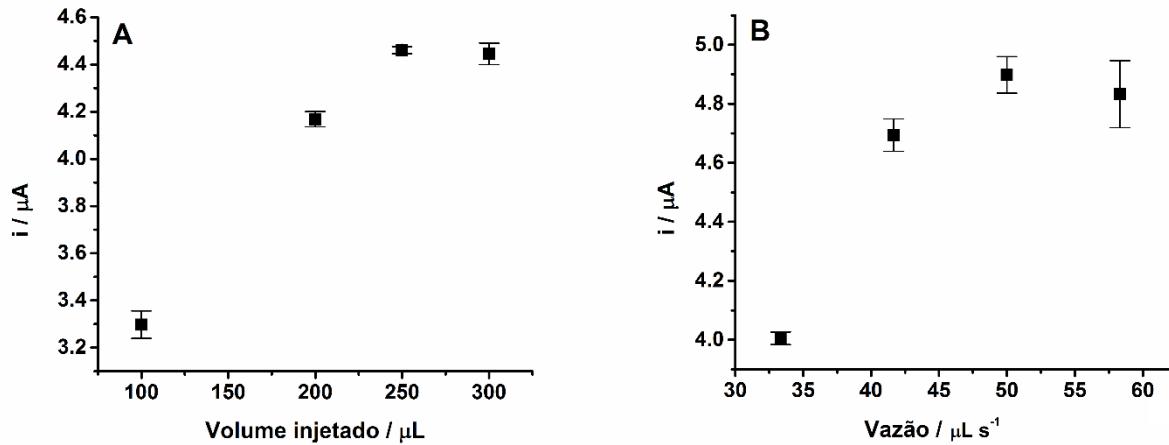


Figura 14 - Otimização dos parâmetros FIA: variação de (A) volume injetado (100, 200, 250 e 300 μ L) e de (B) vazão (33, 42, 50 e 75 μ L s^{-1}) com base em injeções em triplicata de 50 μ mol L^{-1} de CFX. Eletrólito: solução tampão BR pH 4,0.

Um ligeiro aumento de corrente e menor desvio padrão ($n = 3$) foi observado para o volume de injeção de 250 μ L de CFX 50 μ mol L^{-1} no sistema FIA (Figura 14A), desta forma, este foi o valor selecionado para posteriores medidas. Não houve aumento no sinal de oxidação da CFX ao injetar-se volume de 300 μ L de solução. A vazão do sistema FIA (Figura 14B) foi avaliada para CFX 50 μ mol L^{-1} mantendo-se constante o volume de injeção de 250 μ L. Foi observado um aumento na corrente ao variar-se vazão de 33 a 42 μ L s^{-1} , enquanto não houve aumento significativo na corrente, além de maiores desvios padrão serem observados quando se emprega vazões maiores. A vazão de 42 μ L s^{-1} foi, então, selecionada para posteriores

medidas amperométricas. Em seguida, um estudo de repetibilidade foi realizado através de sucessivas injeções de 250 μL de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema FIA (Figura 15).

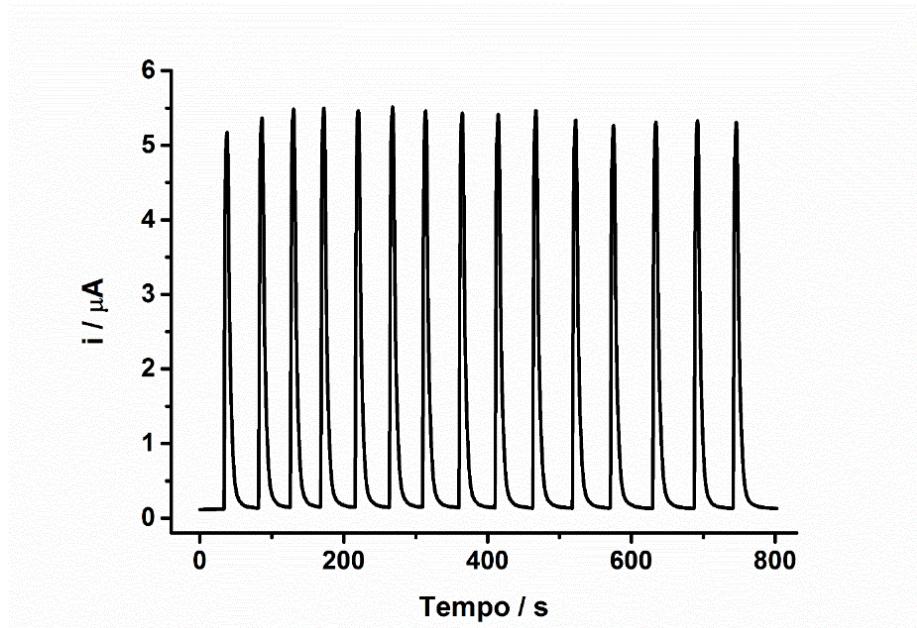


Figura 15 - Amperograma obtido para injeções sucessivas de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 15$). Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 250 μL ; vazão: 42 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Neste estudo, o desvio padrão relativo foi de 1,7 % ($n = 15$). Este resultado demonstra que não há efeito de memória (contaminação do eletrodo) entre injeções sucessivas, não havendo diminuição da corrente de oxidação da CFX durante as análises. A diferença entre os valores de corrente observados entre a Figura 14 e a Figura 15 ocorrem, provavelmente, devido à troca de eletrodos inter-dia de análises.

A faixa linear de trabalho foi avaliada para o sistema FIA empregando-se as condições já otimizadas. Um comportamento linear com elevado coeficiente de correlação foi verificado para CFX de 5 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R > 0,99$). A resposta de corrente não aumenta linearmente para concentrações maiores que 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) sob as condições otimizadas foram calculados seguindo-se as regras da IUPAC, na qual:

$$LD = \frac{3 \times DP_b}{a} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10 \times DP_b}{a} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

DP_b = desvio padrão relativo do branco;

a = coeficiente angular da curva analítica ou sensibilidade da calibração.

Os valores obtidos para LD e LQ foram 0,06 e 0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Respostas amperométricas para injeções em triplicata de CFX contendo concentrações crescentes e decrescentes (10 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) intermediadas pela injeção das amostras (após diluição adequada) são apresentadas na Figura 16.

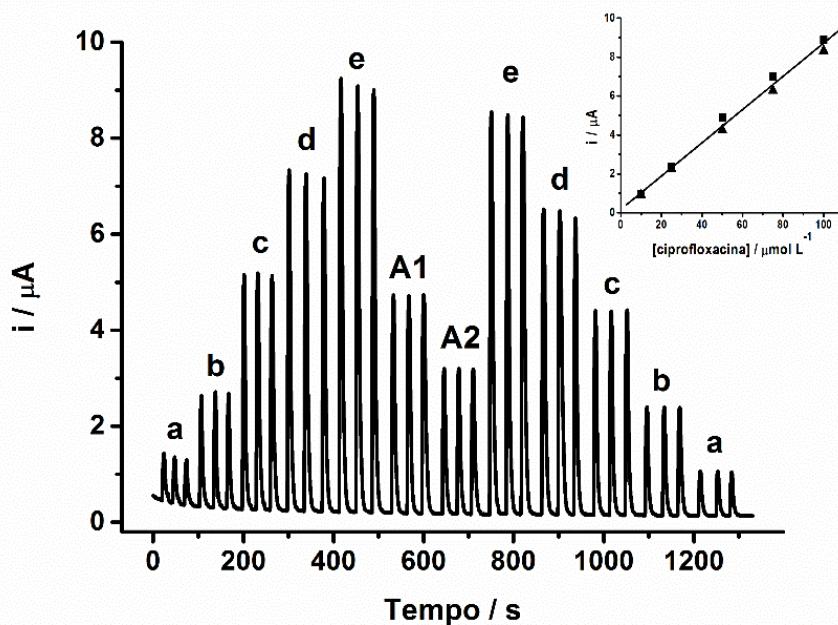


Figura 16 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema FIA de soluções padrão de CFX (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 250 μL ; vazão: 42 $\mu\text{L s}^{-1}$.

As curvas de calibração apresentaram comportamento linear ($R > 0,99$) e neste experimento praticamente não foi observado efeito de memória ou contaminação da superfície do eletrodo, uma vez que o coeficiente angular para as curvas crescente e decrescente são similares. A frequência analítica estimada nesta medida foi de aproximadamente 100 injeções h^{-1} . As equações de reta e os respectivos coeficientes de correlação para as curvas crescente e decrescente são:

$$i (\mu\text{A}) = 0,2009 + 0,0890c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,996 \text{ ordem crescente} (\blacksquare);$$

$$i (\mu\text{A}) = 0,2146 + 0,0819c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,999 \text{ ordem decrescente} (\blacktriangle);$$

Testes de recuperação foram realizados dopando-se ambas amostras com uma solução padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 17).

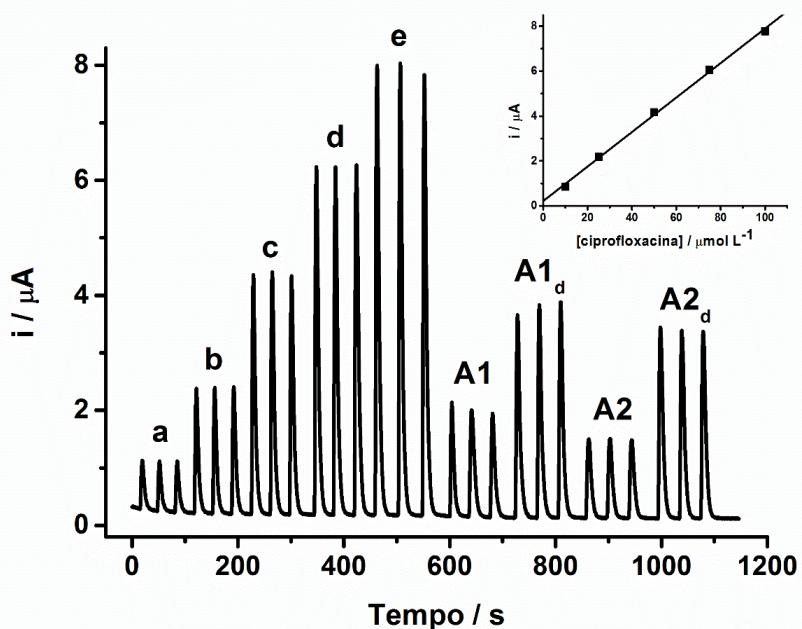


Figura 17 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema FIA de soluções padrão de CFX (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida; A1_d = amostra líquida dopada com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; A2 = comprimido e A2_d = comprimido dopado com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A curva de calibração está inserida na figura. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 250 μL ; vazão: 42 $\mu\text{L s}^{-1}$.

A curva de calibração inserida mostrou boa linearidade ($R > 0,99$) apresentando a seguinte equação:

$$i (\mu\text{A}) = 0,2146 + 0,0768c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,998;$$

Valores de recuperação obtidos mostram ausência de efeito de matriz das amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de recuperação obtidos por análise em FIA-AMP após dopagem da amostra com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Amostra	Dopagem ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A1	25	$23,2 \pm 1,6$	$92,8 \pm 6,2$
A2	25	$24,9 \pm 0,5$	$99,6 \pm 1,9$

Como pode ser observado na Tabela 1, os valores de recuperação de 92,8 e 99,6% foram obtidos para as amostras líquida e comprimido, respectivamente, mostrando que há ausência de efeitos de matriz nesta análise.

4.2.2 Análise por BIA com detecção amperométrica

A oxidação eletroquímica da CFX foi investigada também por meio do sistema de análise por injeção em batelada (BIA). Um voltamograma hidrodinâmico para CFX foi obtido com base em medidas amperométricas obtidas pelo sistema BIA (Figura 18). Este estudo compara a corrente de oxidação obtida em dois diferentes eletrodos (C-SPE e MWCNT-SPE) empregando-se como eletrólito tampão BR 0,1 mol L^{-1} em pH 4,0.

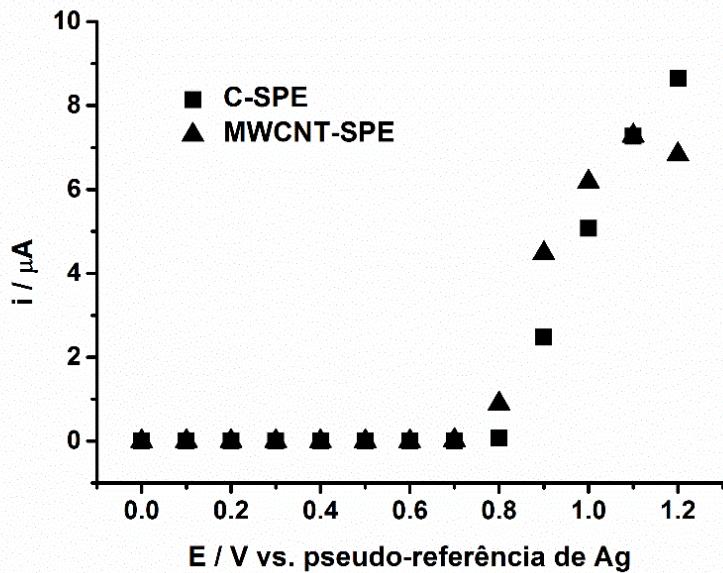


Figura 18 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando-se os valores de corrente de pico (média de 3 injeções) para CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função dos potenciais aplicados no sistema BIA. Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; Eletrodos: MWCNT-SPE e C-SPE.

Similarmente aos voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por meio do sistema FIA, maiores respostas de corrente foram obtidas para o eletrodo MWCNT-SPE em potenciais maiores que +0,8 V. Devido ao comportamento similar e para comparação dos sistemas BIA e FIA, o potencial de trabalho selecionado foi de +1,0 V, sendo este empregado nas posteriores medidas amperométricas.

Os parâmetros BIA foram avaliados para uma solução de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de forma a se obter maiores sinais na corrente de oxidação da CFX e melhores condições de trabalho. A Figura 19 apresenta o efeito de volume injetado (A) e velocidade de dispensa (B), parâmetros estes que são controlados pela micropipeta eletrônica, na corrente de oxidação da CFX.

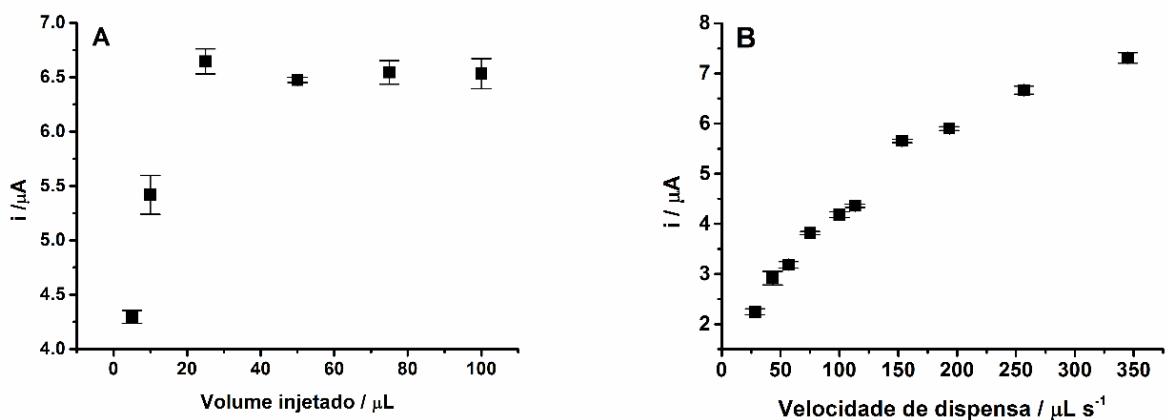


Figura 19 - Otimização dos parâmetros BIA: variação de (A) volume injetado (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μL) e de (B) velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica (28, 43, 57, 75, 100, 113, 153, 193, 257 e 345 $\mu\text{L s}^{-1}$) com base em injeções em triplicata de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CFX. Eletrólito: tampão BR pH 4,0.

A corrente de pico aumentou significativamente com o aumento do volume de injeção de 10 para 25 μL , se mantendo aproximadamente constante de 25 a 100 μL (Figura 19A). O volume de injeção de 50 μL não forneceu maior valor de corrente na oxidação do analito, porém este volume fornece menor valor de desvio padrão ($n = 3$), sendo, portanto, o volume empregado nas análises posteriores. A velocidade de dispensa foi avaliada mantendo-se constante a injeção de 50 μL de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema FIA (Figura 19B). Foi observado um aumento na corrente de acordo com o aumento da velocidade, porém seguiu-se também um leve aumento no desvio padrão ($n = 3$) em velocidades muito altas, provavelmente devido ao fato de o analito ficar em contato com a superfície do eletrodo por um tempo muito pequeno, sendo assim, a velocidade de dispensa escolhida foi de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$. Uma curva amperométrica foi obtida por meio de injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes e decrescentes de CFX (Figura 20).

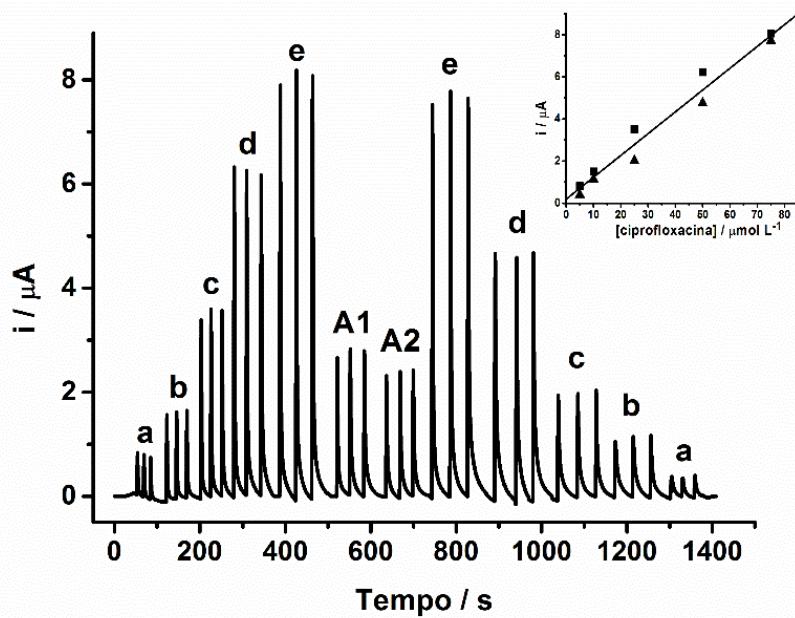


Figura 20 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Um comportamento linear com coeficiente de correlação (R) de 0,98 foi observado em concentrações de 5 a 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CFX. Este experimento mostrou linearidade pior do que aquela obtida pelo sistema FIA ($R > 0,99$) com detecção amperométrica. Além disso, os sinais de corrente obtidos na curva decrescente (coeficiente angular de $0,1005 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}$) foram menores que aqueles obtidos no início da análise (curva crescente, com coeficiente de correlação de $0,1049 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}$). Estes resultados podem ser atribuídos à presença de efeito de memória obtido após a injeção das amostras ou devido à adsorção de produtos de oxidação ou da própria ciprofloxacina na superfície do eletrodo. A limpeza da superfície do eletrodo no sistema BIA pode não ser tão eficiente quanto é no sistema FIA devido ao fluxo constante de solução carreadora, que “lava” a superfície do eletrodo.

De forma a aumentar a linearidade e precisão do método, um sistema de agitação magnética foi adaptado à célula BIA na tentativa de promover uma limpeza eficiente do eletrodo entre as injeções de soluções padrão e das amostras. Para isto, foi necessário reavaliar

os parâmetros BIA empregando também um sistema de agitação. A Figura 21 apresenta a variação nas respostas de corrente para CFX alterando-se o volume de injeção (A) e a velocidade de dispensa (B).

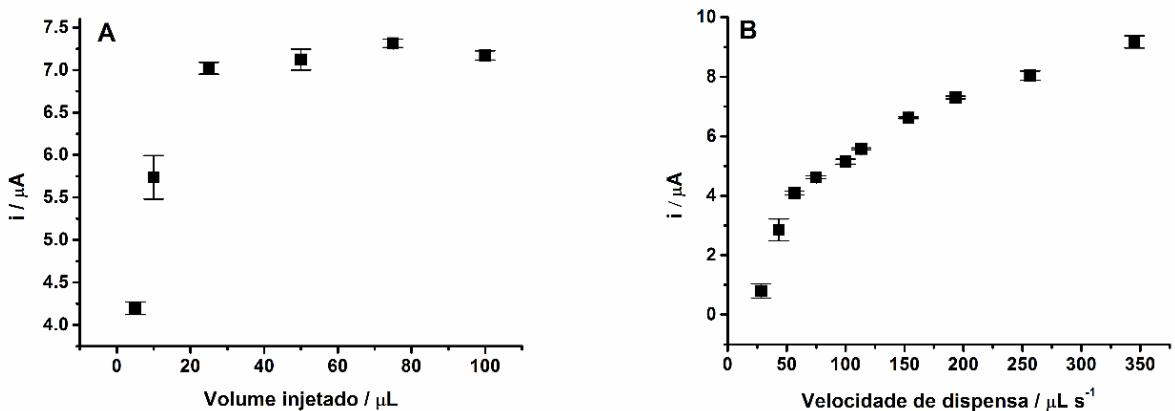


Figura 21 - Otimização dos parâmetros BIA empregando-se sistema de agitação: variação de (A) volume injetado (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μL) e de (B) velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica (28, 43, 57, 75, 100, 113, 153, 193, 257 e 345 $\mu\text{L s}^{-1}$) com base em injeções em triplicata de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CFX. Eletrólito: tampão BR pH 4,0.

A corrente de pico aumentou significativamente com o aumento do volume de injeção de 10 a 50 μL de injeção, e se manteve constante de 50 a 100 μL (Figura 21A). O volume de injeção de 50 μL forneceu maior valor de corrente e menor desvio padrão ($n = 3$), desta forma, este volume foi empregado para os experimentos posteriores. A velocidade de dispensa foi avaliada mantendo-se constante o volume de injeção ótimo de 50 μL utilizando-se uma solução de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A corrente de pico aumentou com o aumento da velocidade de dispensa (Figura 21B). A velocidade escolhida foi de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ pois forneceu um dos maiores valores de corrente além de um baixo desvio padrão ($n=3$).

A faixa linear de trabalho foi avaliada para o sistema BIA empregando-se as condições já otimizadas. Um comportamento linear com um bom coeficiente de correlação foi verificado para CFX de 5 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R > 0,99$). A resposta de corrente não aumenta linearmente para concentrações maiores que 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) sob as condições otimizadas foram calculados seguindo-se as regras da IUPAC como observado pela Equação 2. Os valores obtidos para LD e LQ foram 0,07 e 0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Respostas amperométricas para injeções em triplicata de CFX no sistema BIA com agitação magnética, contendo concentrações crescentes e decrescentes (5 - 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

intermediadas pela injeção das amostras (após diluição adequada) são apresentadas na Figura 22.

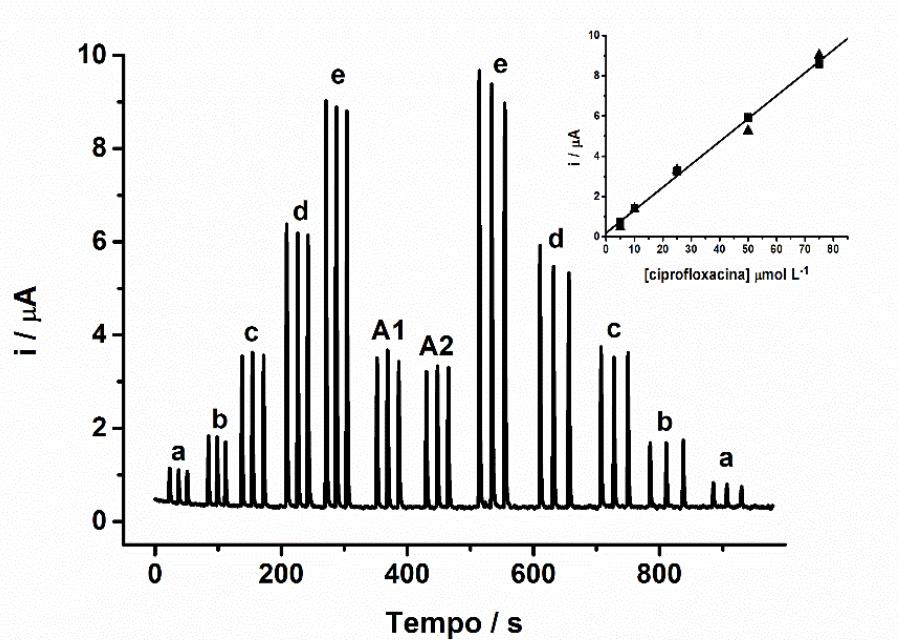


Figura 22 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA, empregando-se agitação, de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida e A2 = comprimido). A curva de calibração inserida corresponde a injeções em concentrações crescentes (■) e decrescentes (▲) de CFX. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$.

As respectivas curvas de calibração (concentrações crescentes e decrescentes de CFX) estão inseridas na Figura 22. As curvas de calibração mostraram uma boa linearidade no intervalo de concentração investigado, apresentando as seguintes equações de reta:

$$i (\mu\text{A}) = 0,2997 + 0,1115c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,998 \text{ ordem crescente (■)};$$

$$i (\mu\text{A}) = 0,0710 + 0,1159c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,999 \text{ ordem decrescente (▲)};$$

O uso de agitação externa no sistema BIA forneceu uma faixa linear mais ampla e melhorou a linearidade (coeficientes de correlação mais próximos de 1), o que contribuiu para maior precisão do método BIA proposto. Por outro lado, a repetibilidade foi ligeiramente afetada devido ao processo de agitação. Injeções sucessivas de 50 μL de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no

sistema BIA forneceu desvio padrão relativo de 4,9 % ($n = 15$), o que ainda é considerado adequado para análises de rotina (Figura 23).

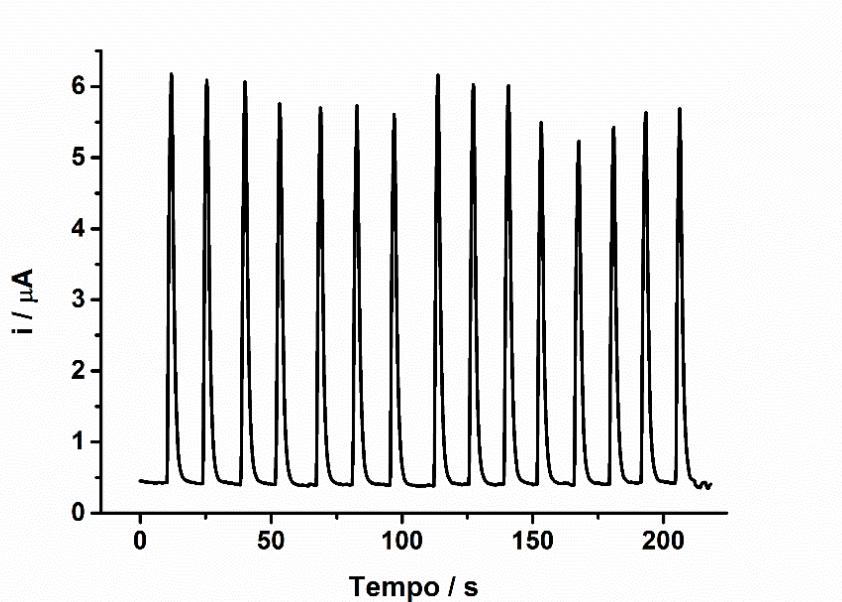


Figura 23 - Amperograma obtido para injeções sucessivas de CFX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 15$) no sistema BIA empregando-se agitação magnética. Potencial de trabalho: +1,0 V; Eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Por fim, a frequência analítica foi substancialmente melhorada (130 h^{-1}) em comparação com BIA sem agitação (92 h^{-1}). Testes de recuperação foram realizados dopando-se ambas amostras com uma solução padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, como pode ser visto na Figura 24.

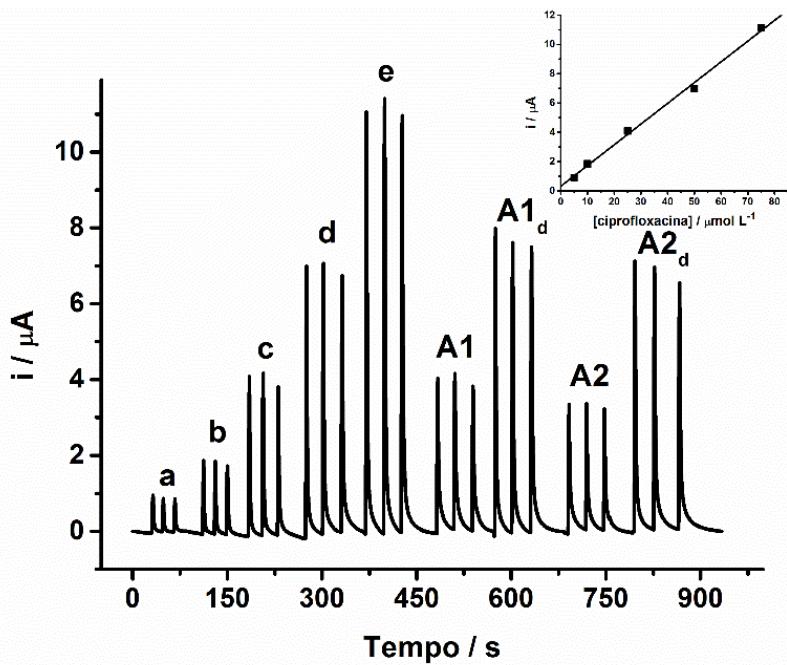


Figura 24 - Respostas amperométricas para injeções em triplicata no sistema BIA, utilizando agitação magnética, de soluções padrão de CFX (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50 e (e) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras comerciais (A1 = amostra líquida; A1_d = amostra líquida dopada com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; A2 = comprimido e A2_d = comprimido dopado com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A curva de calibração está inserida na figura. Potencial de trabalho: +1,0 V; eletrólito: tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; volume injetado: 50 μL ; velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$.

A curva de calibração inserida mostrou boa linearidade ($R > 0,99$) apresentando a seguinte equação:

$$i (\mu\text{A}) = 0,3109 + 0,1416c (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,994.$$

Valores de recuperação obtidos mostram ausência de efeito de matriz das amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de recuperação obtidos por análise em BIA-AMP após dopagem da amostra com padrão de CFX 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Amostra	Dopagem ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A1	25	26,7 \pm 2,2	107 \pm 9
A2	25	25,1 \pm 2,1	100 \pm 9

4.3 Comparação de Métodos

Um estudo que avalia a presença dos interferentes foi realizado através da injeção de soluções padrão de 1 mmol L^{-1} (cada) de estearato de magnésio, amido, dióxido de titânio e hidroxipropilmetilcelulose, os quais estavam presentes nos comprimidos como excipientes. Nenhum destes apresentou resposta eletroquímica sob as condições selecionadas para a determinação de ciprofloxacina, ou seja, não apresentaram interferência na detecção do CFX.

A Tabela 3 mostra as características e parâmetros analíticos para os dois métodos eletroquímicos. Pode ser observado que os métodos eletroquímicos propostos apresentaram características analíticas apropriadas para a determinação de CFX.

Tabela 3 - Características analíticas e parâmetros para os métodos propostos na determinação de ciprofloxacina nas condições otimizadas.

Características	FIA-AMP	BIA-AMP	BIA-AMP (com agitação)
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5 - 200	5 - 75	5 - 150
Coeficiente de correlação	0,998	0,983	0,999
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,06	0,03	0,07
Inclinação da curva ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,0768	0,1049	0,1115
Frequência analítica (h^{-1})	99	92	130
DPR (n = 15)	1,7 %	2,1 %	4,9 %
Parâmetros			
Velocidade de dispensa ($\mu\text{L s}^{-1}$)	42	153	153
Volume de injeção (μL)	250	50	50

O uso de agitação no sistema BIA melhorou a linearidade das curvas de calibração (coeficientes de correlação), aumentando a faixa linear do método e aumentando a frequência analítica. As melhorias verificadas com o emprego de agitação no sistema BIA provavelmente ocorreram devido às características adsortivas da ciprofloxacina ou de produtos de oxidação gerados na superfície do eletrodo de trabalho que recobrem sua superfície (Yi e Li, 2007). O sistema FIA forneceu faixa linear ligeiramente maior que o sistema BIA (com agitação), porém, uma sensibilidade menor. Este resultado pode ser explicado devido à velocidade do fluxo quatro vezes maior alcançada no sistema BIA em comparação com o FIA. Similar resultado foi verificado em trabalho da literatura que comparou os sistemas BIA e FIA usando eletrodos convencionais de carbono vítreo (Ferreira *et al.*, 2012). Os métodos apresentaram curto tempo de análise, baixos valores de limite de detecção e alta precisão (valores de DPR < 5%).

A frequência analítica foi estimada com base nos dados experimentais apresentados neste trabalho. No entanto, se considerar o tempo de sinal transiente de corrente (após completo decaimento à linha base), a frequência analítica (teórica) seria de 450 h^{-1} (≈ 8 segundos cada pico) para o sistema BIA sob agitação e 180 h^{-1} (≈ 20 segundos cada pico) para o sistema FIA. Ambos valores de frequência analítica são menores que aqueles obtidos para a determinação de ciclopirox em eletrodo de carbono puro (Ferreira *et al.*, 2012), o que pode ser explicado pela diferença no modelo das células BIA e FIA e, principalmente, pela cinética das reações nas diferentes superfícies de eletrodo de trabalho.

Os métodos propostos BIA (com agitação) e FIA foram usados para determinar ciprofloxacina em duas amostras farmacêuticas. Para comparação, as amostras também foram analisadas por CE-C₄D (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos resultados obtidos na determinação de CFX em formulações farmacêuticas por FIA, BIA e CE-C⁴D ($n = 3$).

Amostra	Valor do rótulo	FIA	BIA	BIA (com agitação)	CE-C ⁴ D
A1	10	$10,2 \pm 0,1$	$9,9 \pm 1,7$	$10,8 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,1$
	g /100 mL	g/100 mL	g/100 mL	g / 100 mL	g/100 mL
A2	500 mg	527 ± 1 mg	424 ± 84 mg	497 ± 10 mg	518 ± 10 mg

Os resultados obtidos pelos três métodos propostos estão de acordo com aqueles obtidos por CE-C⁴D com 95% de confiança (os valores de *t* calculados para o teste *t* de *Student* pareado foram menores que o valor crítico, 2,78 para *n* = 3) atestando que não há diferenças significativas entre os resultados. Os resultados apresentados confirmam que os métodos possuem desempenho similar ao CE-C⁴D na determinação de ciprofloxacina.

A Tabela 5 compara os métodos propostos FIA e BIA acoplados à detecção amperométrica com outros métodos eletroanalíticos para a determinação de ciprofloxacina reportados na literatura (Yi e Li, 2007; Ensafi *et al.*, 2010; Fotouhi e Alahyari, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2014; Garbellini *et al.*, 2015).

Tabela 5 - Comparação das características analíticas dos métodos propostos (BIA - com agitação) e FIA, com detecção amperométrica (AMP), com outros métodos eletroanalíticos para a determinação de ciprofloxacina reportados na literatura.

Eletrodo de trabalho	Método	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Freq. Analítica (h^{-1})	Amostras	Referência
EPC	DPV	0,1 – 20	0,05	N.M.	Fármacos	(Yi e Li, 2007)
EPC/β-CD e L-Arg	DPV	0,05 – 100	0,01	N.M.	Fármacos e plasma	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
DDB	BIA-AMP	1 – 100	0,3	120	Fármacos e leite	(Montes <i>et al.</i> , 2014)
DDB	VPD	0,5 – 60	0,44	N.M.	Urina sintética	(Garbellini <i>et al.</i> , 2015)
DDB	SWV	2,5 – 50	2,46	N.M.	Urina sintética	(Garbellini <i>et al.</i> , 2015)
MWCNT-GCE	LSV	40 – 1000	6	N.M.	Urina e plasma	(Fotouhi e Alahyari, 2010)
MWCNT-GCE	LSV	3 – 1200	0,9	N.M.	Fármacos, plasma e urina	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010)
MgFeSO ₄ -MWCNT-GCE	LSV	0,1 – 1000	0,01	N.M.	Fármacos, plasma e urina	(Ensafi <i>et al.</i> , 2012)
Grafeno/PAR-GCE	DPV	0,04 – 120	0,01	N.M.	Fármacos e plasma	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
MWCNT-SPE	FIA-AMP	5 – 200	0,06	100	Fármacos	Este trabalho
MWCNT-SPE	BIA-AMP	5 – 150	0,07	130	Fármacos	Este trabalho

N.M. = não mencionado.

Os sistemas propostos usando SPEs descartáveis apresentaram performance superior à análises empregando-se eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro utilizando sistema BIA. O uso de MWCNT (Fotouhi e Alahyari, 2010) ou nanopartículas metálicas ligadas a MWCNT (Ensafi *et al.*, 2010) como modificadores do eletrodo de carbono vítreo forneceram ampla faixa linear e valores de limite de detecção similares, ou mesmo menores. A partir destes

resultados, ficam claros os benefícios do uso de MWCNTs como modificadores químicos em diferentes substratos de carbono.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado o potencial uso de eletrodos impressos de carbono modificados com nanotubos de paredes múltiplas para a determinação de ciprofloxacina usando os sistemas FIA e BIA. O sistema BIA com detecção amperométrica requer etapa adicional de agitação da solução na célula para a determinação de ciprofloxacina com exatidão devido à contaminação do eletrodo com o analito ou seus produtos de oxidação. Este efeito foi reduzido com a utilização do método FIA devido ao fluxo contínuo de eletrólito suporte na superfície do eletrodo. Ambos métodos BIA e FIA apresentaram ampla faixa linear de trabalho, baixos limites de detecção, alta precisão e exatidão adequada (atestada pelos testes de recuperação e comparação com eletroforese capilar) para a determinação de ciprofloxacina em formulações farmacêuticas.

O sistema BIA forneceu maior sensibilidade devido à maior velocidade de fluxo no qual as soluções foram submetidas quando injetadas na superfície do eletrodo de trabalho. No entanto, valores de limite de detecção similares para ambos os métodos foram obtidos. O sistema BIA apresentou maior frequência analítica, sobretudo com agitação acoplada à célula. Uma vantagem adicional do sistema BIA com relação ao sistema FIA é a portabilidade deste sistema analítico especialmente quando este é combinado com eletrodos impressos descartáveis, pois as bombas, válvulas, tubos, reservatório de eletrólito e célula FIA são substituídos por uma simples célula BIA associada a uma micropipeta eletrônica. Além disso, nenhum dos dois métodos desenvolvidos requer morosa manipulação da amostra (requer apenas diluições em eletrólito), ou instrumentação cara, portanto, podem ser aplicados para análises de rotina.

Em casos de análises em que a sensibilidade não for fator de grande importância quando comparado ao custo na análise de ciprofloxacina em fármacos, o C-SPE poderia ser utilizado como eletrodo de trabalho em substituição ao MWCNT-SPE, uma vez que o aumento no sinal analítico foi de apenas 10% (obtido com MWCNT-SPE's com relação aos C-SPE's) e os C-SPE's possuem menor custo, porém, neste trabalho, não foram realizados testes com este eletrodo.

6 TRABALHOS REALIZADOS

PUBLICAÇÕES DE ARTIGOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS DURANTE O MESTRADO:

STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A.; Batch-injection versus flow-injection analysis using screenprinted electrodes: determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations, **Electroanalysis**, v. 28, n. 2, p. 350-357, 2016.

DEMAIS PUBLICAÇÕES DE ARTIGOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS:

STEFANO, J. S.; LIMA, A. P.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A.; Fast Determination of Naproxen in Pharmaceutical Formulations by Batch Injection Analysis with Pulsed Amperometric Detection, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, 2012.

LIMA, A. P.; STEFANO, J. S.; CUNHA, R. R.; JUVÊNCIO, L. A. A.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A.; Electrochemical Oxidation of Chlorhexidine and its Amperometric Determination by Flow-Injection Analysis, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 448-452, 2014.

STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A.; Flow-Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry for Simultaneous Determination of Paracetamol and Naproxen Using a Homemade Flow Cell for Screen-Printed Electrodes, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 484-491, 2014.

MONTES, R. H. O.; STEFANO, J. S.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. Exploring Multiwalled Carbon Nanotubes for Naproxen Detection, **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1449-1453, 2014.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYAN, P. M. Nanotubes from carbon. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 7, p. 1787-1799, 1999.
- ALMEIDA, E. S.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. On-site fuel electroanalysis: Determination of lead, copper and mercury in fuel bioethanol by anodic stripping voltammetry using screen-printed gold electrodes. **Analytica chimica acta**, v. 837, p. 38-43, 2014.
- BANKS, C. E.; COMPTON, R. G. New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite. **Analyst**, v. 131, n. 1, p. 15-21, 2006.
- BANKS, C. E.; DAVIES, T. J.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites. **Chemical Communications**, n. 7, p. 829-841, 2005.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, p. 703, 1980.
- BEINROHR, E.; TSCHÖPEL, P.; TÖLG, G.; NÉMETH, M. Flow-through anodic stripping coulometry and anodic stripping coulometry with collection for the simultaneous absolute determination of copper, lead, cadmium and zinc. **Analytica chimica acta**, v. 273, n. 1, p. 13-25, 1993.
- BERGAMIN F. H.; ZAGATTO, E.; KRUG, F.; REIS, B. Merging zones in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, n. 1, p. 17-23, 1978.
- BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 1, p. 315-319, 2007.

BERNALTE, E.; MARÍN SÁNCHEZ, C.; PINILLA, G. E. High-Throughput Mercury Monitoring in Indoor Dust Microsamples by Bath Ultrasonic Extraction and Anodic Stripping Voltammetry on Gold Nanoparticles-Modified Screen-Printed Electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 289-294, 2013.

BERNALTE, E.; SÁNCHEZ, C. M.; GIL, E. P. Determination of Mercury in indoor dust samples by ultrasonic probe microextraction and stripping voltammetry on gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 97, p. 187-192, 2012.

BILIBIO, U. **Determinação eletroanalítica individual e simultânea das fluoroquinolonas, levofloxacina e norfloxacina, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução.** 2014. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2014.

BOCKRIS, J.; REDDY, O. M.; AMULYA, K. N. **Modern Electrochemistry.** Ionics, 2002.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações.** Almedina Coimbra, 1996.

BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1456-1462, 1931.

CATARINO, R. I.; CONCEIÇÃO, A. C.; GARCIA, M. B. Q.; GONÇALVES, M.; LIMA, J. L.; DOS SANTOS, M. C. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 33, n. 4, p. 571-580, 2003.

CHIU, M. H.; KUMAR, A. S.; SORNAMBIKAI, S.; ZEN, J. M.; SHIH, Y. Flow Injection Analysis of Aluminum Chlorhydrate in Antiperspirant Deodorants Using a Built-in Three-in-one Screen-Printed Silver Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 20, p. 2421-2427, 2010.

COUTO, R.; LIMA, J.; QUINAZ, M. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, p. 801-814, 2016.

CUMBA, L. R.; SMITH, J. P.; BROWNSON, D. A.; INIESTA, J.; METTERS, J. P.; DO CARMO, D. R.; BANKS, C. E. Electroanalytical detection of pindolol: comparison of unmodified and reduced graphene oxide modified screen-printed graphite electrodes. **Analyst**, v. 140, n. 5, p. 1543-1550, 2015.

DE CARVALHO, R. M.; FREIRE, R. S.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 34, n. 5, p. 871-878, 2004.

DE CASTRO RODRIGUES JUNIOR, L.; SALDANHA HONORATO, R. O. **Metodologia cinética em fluxo não interrompido: determinação de dopamina em fármacos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A. R.; MOHAMMADZADEH, R. Characterization of MgFe₂O₄ nanoparticles as a novel electrochemical sensor: application for the voltammetric determination of ciprofloxacin. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 7, p. 705-710, 2012.

ENSAFI, A. A.; TAEI, M.; KHAYAMIAN, T.; HASANPOUR, F. Simultaneous voltammetric determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in urine and plasma using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode by least-squares support vector machines. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 7, p. 803-808, 2010.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V.; DE OLIVEIRA, M. A. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389-396, 2008.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with flow injection analysis. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 12, p. 4784-4804, 2010.

FERREIRA, L.; FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast determination of ciclopirox in pharmaceutical products by amperometry in flow and batch injection systems. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 961-966, 2012.

FOTOUHI, L.; ALAHYARI, M. Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 110-114, 2010.

FRANCISCO, K. J. M.; DO LAGO, C. L. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3458-3464, 2009.

FRANK, S.; PONCHARAL, P.; WANG, Z.; DE HEER, W. A. Carbon nanotube quantum resistors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1744-1746, 1998.

GARBELLINI, G. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of ciprofloxacin in urine samples and its interaction with dsDNA on a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 3411-3418, 2015.

GIMENES, D. T. **Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e determinação simultânea de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos**. 2013. Tese (Doutorado em química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

GIMENES, D. T.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 216-218, 2010.

GIMENES, D. T.; PEREIRA, P. F.; CUNHA, R. R.; BEZERRA DA SILVA, R. A.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple strategy to improve the accuracy of the injection step in batch injection analysis systems with amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 9, p. 1805-1810, 2012.

HAGHIGHI, B.; RAHMATI-PANAH, A.; SHLEEV, S.; GORTON, L. Carbon ceramic electrodes modified with laccase from *Trametes hirsuta*: fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection. **Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 907-917, 2007.

HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 10432-10453, 2014.

HENDERSON, D. A.; INGLESBY, T. V.; BARTLETT, J. G.; ASCHER, M. S.; EITZEN, E.; JAHLING, P. B.; HAUER, J.; LAYTON, M.; MCDADE, J.; OSTERHOLM, M. T. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. **Jama**, v. 281, n. 22, p. 2127-2137, 1999.

HENRÍQUEZ, C.; LAGLERA, L.; ALPIZAR, M.; CALVO, J.; ARDUINI, F.; CERDÀ, V. Cadmium determination in natural water samples with an automatic multisyringe flow injection system coupled to a flow-through screen printed electrode. **Talanta**, v. 96, p. 140-146, 2012.

HERNÁNDEZ, M.; AGUILAR, C.; BORRULL, F.; CALULL, M. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachophoresis–capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 772, n. 1, p. 163-172, 2002.

HSU, C.-T.; CHUNG, H.-H.; LYUU, H.-J.; TSAI, D.-M.; KUMAR, A. S.; ZEN, J.-M. An electrochemical cell coupled with disposable screen-printed electrodes for use in flow injection analysis. **Analytical sciences**, v. 22, n. 1, p. 35-38, 2006.

IDOWU, O. R.; PEGGINS, J. O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 1, p. 143-153, 2004.

JI, X.; KADARA, R. O.; KRUESSMA, J.; CHEN, Q.; BANKS, C. E. Understanding the physicoelectrochemical properties of carbon nanotubes: current state of the art. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 7-19, 2010.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J.; MARTÍNEZ, M. E. A. **Farmacología básica e clínica**. 2014.

LESHER, G. Y.; FROELICH, E. J.; GRUETT, M. D.; BAILEY, J. H.; BRUNDAGE, R. P. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.

LI, M.; LI, Y.-T.; LI, D.-W.; LONG, Y.-T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. **Analytica chimica acta**, v. 734, p. 31-44, 2012.

LIANG, W.; BOCKRATH, M.; BOZOVIC, D.; HAFNER, J. H.; TINKHAM, M.; PARK, H. Fabry-Perot interference in a nanotube electron waveguide. **Nature**, v. 411, n. 6838, p. 665-669, 2001.

MACHADO, I. R. L.; MENDES, H. M. F.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R. Nanotubos de carbono: potencial de uso em medicina veterinária. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1823-1829, 2014.

METTERS, J. P.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **Analyst**, v. 136, n. 6, p. 1067-1076, 2011.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, n. 1, p. 267-272, 2004.

MONTES, R. H.; MARRA, M. C.; RODRIGUES, M. M.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. Fast determination of ciprofloxacin by batch injection analysis with amperometric detection

and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electroanalysis**, v. 26, n. 2, p. 432-438, 2014.

MONTES, R. H. O. Efeito do Tamanho de Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas em Sensores Eletroquímicos para Moléculas de Interesse Farmacêutico. 2015. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015

MOZO, J.; CARBAJO, J.; STURM, J.; NÚÑEZ-VERGARA, L.; SALGADO, P.; SQUELLA, J. Determination of Nifuroxazide by Flow Injection Linear Adsorptive Stripping Voltammetry on a Screen-Printed Carbon Nanofiber Modified Electrode. **Electroanalysis**, v. 24, n. 3, p. 676-682, 2012.

MUSAMEH, M.; WANG, J.; MERKOCI, A.; LIN, Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 10, p. 743-746, 2002.

NAGARALLI, B.; SEETHARAMAPPA, J.; MELWANKI, M. Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxycillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 5, p. 859-864, 2002.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Quim. Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 1998.

NAVALÓN, A.; BALLESTEROS, O.; BLANC, R.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of ciprofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. **Talanta**, v. 52, n. 5, p. 845-852, 2000.

NECKEL, U.; JOUKHADAR, C.; FROSSARD, M.; JÄGER, W.; MÜLLER, M.; MAYER, B. X. Simultaneous determination of levofloxacin and ciprofloxacin in microdialysates and plasma by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, n. 2, p. 199-206, 2002.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706-723, 1964.

O'DEA, P.; GARCÍA, A. C.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T.; SMYTH, M. R. Determination of ciprofloxacin by differential pulse polarography. **Electroanalysis**, v. 2, n. 8, p. 637-641, 1990.

O'DEA, P.; GARCÍC, A. C.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T.; SMYTH, M. R. Comparison of adsorptive stripping voltammetry at mercury and carbon paste electrodes for the determination of ciprofloxacin in urine. **Electroanalysis**, v. 3, n. 4-5, p. 337-342, 1991.

PASCUAL-REGUERA, I.; PARRAS, G. P. Solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin. **Microchemical journal**, v. 77, n. 1, p. 79-84, 2004.

PEDROSA, V. A.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. FIA Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Drugs by Using Gold Electrodes Modified with a 3-Mercaptopropionic Acid Monolayer. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 931-934, 2006.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.

PIÑERO, M. Y.; GARRIDO-DELGADO, R.; BAUZA, R.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Easy sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in raw bovine milk by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 33, n. 19-20, p. 2978-2986, 2012.

PULGARÍN, J. M.; MOLINA, A. A.; BORAS, N. Rapid determination of ciprofloxacin in urine by matrix isopotential synchronous spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, n. 10, p. 3413-3419, 2012.

QUINTINO, M. D. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas.** 2003. Tese (Doutorado em Química) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

QUINTINO, M. S.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.

ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. D. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119-125, 2000.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

SALGADO-FIGUEROA, P.; JARA-ULLOA, P.; ALVAREZ-LUEJE, A.; SQUELLA, J. Sensitive Determination of Nitrofurantoin by Flow Injection Analysis Using Carbon Nanofiber Screen Printed Electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 6, p. 1433-1438, 2013.

SHAN, J.; LIU, Y.; LI, R.; WU, C.; ZHU, L.; ZHANG, J. Indirect electrochemical determination of ciprofloxacin by anodic stripping voltammetry of Cd (II) on graphene-modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 123-129, 2015.

SILVA, R. A. B. D. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho.** Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

SKOOG, D. A. H., F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of Instrumental Analysis. 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. **5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing.**, 1998.

STEFANO, J. S.; LIMA, A. P. D.; MONTES, R. H.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with

pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, 2012.

STEFANO, J. S.; MONTES, R. H.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. Flow-injection analysis with multiple-pulse amperometry for simultaneous determination of paracetamol and naproxen using a homemade flow cell for screen-printed electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 484-491, 2014.

STREETER, I.; WILDGOOSE, G. G.; SHAO, L. D.; COMPTON, R. G. Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: An analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 133, n. 2, p. 462-466, Aug 2008.

SULOCHANA, S.; RAHMAN, F.; PARAMASIVAN, C. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of chemotherapy**, v. 17, n. 2, p. 169-173, 2005.

SUN, H.-W.; LI, L.-Q.; CHEN, X.-Y. Flow-injection enhanced chemiluminescence method for determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 384, n. 6, p. 1314-1319, 2006.

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9-10, p. 865-891, 2014.

THIEN-NGA, L.; BONARD, J. M.; GAAL, R.; FORRO, L.; HERNADI, K. Comparison of catalytically grown and arc-discharge carbon nanotube tips. **Applied Physics Letters**, v. 80, n. 5, p. 850-852, Feb 2002.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93-98, 2014.

TRISTÃO, J. C.; MOURA, F. V. C. C.; LAGO, R. M.; SAPAG, K. Sistema RTP: uma técnica poderosa para o monitoramento da formação de nanotubos de carbono durante o processo por deposição de vapor químico. **Química Nova**, v. 33, p. 1379-1383.

TSE, Y.-H.; JANDA, P.; LAM, H.; LEVER, A. Electrode with electropolymerized tetraaminophthalocyanatocobalt (II) for detection of sulfide ion. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 981-985, 1995.

VYBIRALOVA, Z.; NOBILIS, M.; ZOULOVA, J.; KVĚTINA, J.; PETR, P. High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 37, n. 5, p. 851-858, 2005.

WANG, J. Portable electrochemical systems. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 226-232, 2002.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

WILDGOOSE, G. G.; BANKS, C. E.; LEVENTIS, H. C.; COMPTON, R. G. Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis. **Microchimica Acta**, v. 152, n. 3-4, p. 187-214, 2006.

YI, H.; LI, C. Voltammetric determination of ciprofloxacin based on the enhancement effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at carbon paste electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1377-1381, 2007.

ZAGATTO, E.; KRUG, F.; REIS, B. Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, n. 1, p. 17-23, 1978.

ZHANG, F.; GU, S.; DING, Y.; ZHANG, Z.; LI, L. A novel sensor based on electropolymerization of β -cyclodextrin and L-arginine on carbon paste electrode for determination of fluoroquinolones. **Analytica chimica acta**, v. 770, p. 53-61, 2013.

ZHANG, S.; WEI, S. Electrochemical determination of ciprofloxacin based on the enhancement effect of sodium dodecyl benzene sulfonate. **Bulletin-korean chemical society**, v. 28, n. 4, p. 543, 2007.

ZHANG, X.; WEI, Y.; DING, Y. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of ciprofloxacin employing poly (alizarin red)/graphene composite film in the presence of ascorbic acid, uric acid and dopamine. **Analytica chimica acta**, v. 835, p. 29-36, 2014.

ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. **Elsevier Science; 1 edition**, 2007.