

## Sumário

O presente trabalho tem como objectivo o desenvolvimento de um método analítico, baseado na voltametria de onda quadrada (SWV), para a análise de ciprofloxacina (CIP) em produtos farmacêuticos e em processos de remediação.

Para o desenvolvimento do método voltamétrico foram utilizadas duas células voltamétricas: a célula clássica (utilizando um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo - GCE) e um eléctrodo de carbono impresso (SPCE).

Após a optimização dos parâmetros da SWV, pH (3,04), frequência (400Hz), incremento de potencial (6 mV) e amplitude do impulso de potencial (40 mV), procedeu-se a validação dos métodos, obtendo-se zonas lineares entre a concentração de CIP e a intensidade de corrente de pico de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L (GCE) e de  $1,0 \times 10^{-5}$  a  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L (SPCE) e limites de detecção de  $9,48 \times 10^{-6}$  mol/L (GCE) e  $2,13 \times 10^{-6}$  mol/L (SPCE). Verificou-se que a sensibilidade, a precisão e a selectividade são superiores para o SPCE, sendo por isso esta a célula mais adequada para proceder à análise da CIP em produtos farmacêuticos. O SPCE foi aplicado com sucesso à análise de CIP num produto farmacêutico.

Para o tratamento de soluções aquosas contendo a CIP foram testados dois oxidantes: o permanganato de potássio e o peróxido de hidrogénio. Para o peróxido de hidrogénio os resultados obtidos foram inconclusivos. No caso do permanganato de potássio, os resultados mostram que a degradação da ciprofloxacina depende da concentração do oxidante. Para uma concentração de CIP de  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L uma degradação rápida foi obtida com o uso de  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L de permanganato de potássio.

Na aplicação do permanganato na remediação de solos verificou-se que no caso de solos húmicos a ciprofloxacina é adsorvida pelo solo, não sendo possível confirmar a ocorrência da reacção de degradação. No caso de solos arenosos verificou-se que a ciprofloxacina foi rapidamente degradada pelo permanganato de potássio.

Palavras-chave: ciprofloxacina, voltametria onda quadrada, eléctrodo de carbono vítreo, eléctrodo de carbono impresso, remediação

## Abstract

The goal of the present work is to develop an analytical method, based on square-wave voltammetry (SWV), for the analysis of ciprofloxacin (CIP) in pharmaceutical products and remediation processes.

For the development of the voltammetric method two different voltammetric cells were used: a classical cell (using a glassy-carbon working electrode - GCE) and a screen-printed carbon electrode (SPCE).

After the optimization of the SWV parameters, pH (3,04), frequency (400Hz), pulse step (6 mV) and pulse amplitude (40 mV), validation of the developed methods was performed, obtaining linear relations between CIP concentration and peak current intensity from  $5,0 \times 10^{-6}$  to  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L (GCE) and from  $1,0 \times 10^{-5}$  to  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L (SPCE) and detection limits of  $9,48 \times 10^{-6}$  mol/L (GCE) and  $4,02 \times 10^{-6}$  mol/L (SPCE). For the SPCE the sensitivity, precision, and selectivity were higher when compared with the classical cell. Therefore this cell was found to be more adequate for the analysis of CIP in pharmaceutical products and was successfully applied in the quantification of CIP.

The treatment of CIP in aqueous solutions was performed using two oxidants: potassium permanganate and hydrogen peroxide. The tests of hydrogen peroxide led to inconclusive results. The results obtained with potassium permanganate show that the degradation of CIP depends on the oxidant's concentration. For a  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L concentration of CIP a fast degradation was observed using  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L permanganate.

In the application of permanganate in the remediation of soils it was verified that CIP is adsorbed by humic soils, making the verification of the degradation reaction impossible. In the case of sandy soils, CIP is rapidly degraded by potassium permanganate.

Key words: ciprofloxacin, square-wave voltammetry, glassy carbon electrode, screen-printed carbon electrodes, remediation

## Índice

1. Introdução .....	9
1.1. Estatística de venda de medicamentos.....	10
1.2. Antibióticos .....	11
1.3. Ciprofloxacina .....	12
1.4. Voltametria .....	15
1.4.1. Voltametria Hidrodinâmica .....	17
1.4.2. Polarografia de varrimento linear .....	17
1.4.3. Voltametria de impulso diferencial (DPV).....	18
1.4.4. Voltametria de onda quadrada .....	19
1.4.5. Voltametria cíclica.....	21
1.4.6. Métodos de redissolução .....	22
1.5. Eléctrodos de carbono impresso .....	24
1.6. Validação de métodos analíticos .....	25
1.6.1. Linearidade .....	25
1.6.2. Limites de detecção e de quantificação .....	25
1.6.3. Precisão.....	26
1.6.4. Exactidão .....	26
1.6.5. Selectividade.....	26
1.7. Remediação de contaminantes.....	26
2. Condições Experimentais .....	31
2.1. Instrumentação.....	31
2.2. Reagentes e soluções .....	34
2.2.1. Voltametria .....	34
2.2.2. Remediação .....	36
2.3. Procedimentos gerais.....	37
2.3.1. Ensaio voltamétricos .....	37
2.3.2. Estudos preliminares e de optimização .....	37
2.3.4. Validação dos métodos desenvolvidos .....	38
2.3.5. Doseamento da ciprofloxacina numa formulação farmacêutica.....	39
2.3.6. Remediação de solos .....	39
3. Resultados.....	41
3.1. Optimização (GCE) .....	41
3.2. Validação .....	45
3.2.1. Eléctrodo de carbono vítreo (GCE) .....	45
3.2.2. Eléctrodo de carbono impresso (SPCE) .....	49
3.3. Remediação .....	55
3.3.1. Interferência do permanganato potássio, peróxido de hidrogénio e manganês .....	55
3.3.2. Permanganato de potássio e peróxido de hidrogénio .....	56
3.3.3. Ensaio com solo húmico/areia .....	57
4. Conclusão .....	63
5. Estudos Futuros .....	66
6. Bibliografia.....	67
Anexos.....	71
Anexo I – Resultados da Optimização e Validação .....	71
Anexo II – Resultados da Remediação.....	85

Anexo III - Ficha segurança da CIP ..... 89

## Índice de figuras

Figura 1: Estrutura química da Ciprofloxacina .....	12
Figura 2: Sinais de excitação empregados em voltametria.....	16
Figura 3: Sinais de excitação para a voltametria diferencial. ....	18
Figura 4: Voltograma obtido por DPV .....	19
Figura 5: Esquema de aplicação do potencial e medição da intensidade de corrente ao longo do tempo na voltametria de onda quadrada. ....	20
Figura 6: Voltamograma teórico associado a SWV para um sistema reversível.....	20
Figura 7: Sinal de excitação em voltametria cíclica .....	21
Figura 8: Sinal de excitação e respectivo voltograma de redissolução anódica. ....	23
Figura 9: Representação de uma célula de eléctrodo de carbono impresso. ....	24
Figura 10: Equipamento utilizado nos ensaios voltamétricos. ....	31
Figura 11: Eléctrodo de trabalho (GCE) utilizado na célula clássica. ....	32
Figura 12: Eléctrodo de referência (Ag/AgCl/KCl 3mol/L) utilizado na célula clássica. ...	32
Figura 13: Eléctrodo auxiliar (carbono vítreo) utilizado na célula clássica. ....	32
Figura 14: Representação da célula voltamétrica clássica.....	33
Figura 15: Representação da célula voltamétrica SPCE. ....	34
Figura 16: Efeito do pH do electrólito na $i_p$ de uma solução de CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) na análise por SWV.....	41
Figura 17: Efeito da frequência na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04). ....	42
Figura 18: Efeito do incremento de potencial na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04).....	43
Figura 19: Efeito da amplitude do impulso de potencial na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04). ....	44
Figura 20: Estudo da linearidade entre a $i_p$ e a concentração da CIP (GCE). ....	45
Figura 21: Representação da curva de calibração (GCE).....	46
Figura 22: Voltamogramas obtidos na análise de CIP por SWV em tampão Britton-Robinson (pH=3,04) na zona linear (GCE) ( $f=400\text{Hz}$ ; $\Delta E_S=6,00\text{mV}$ ; $\Delta E_P=40,05\text{mV}$ ). ....	47
Figura 23: Representação da curva de calibração e da curva de adição padrão (GCE). ....	49
Figura 24: Representação da curva de calibração (SPCE). ....	50
Figura 25: Voltamogramas obtidos na análise de CIP por SWV em tampão Britton-Robinson (pH=3,04) na zona linear (SPCE) ( $f=400\text{Hz}$ ; $\Delta E_S=6,00\text{mV}$ ; $\Delta E_P=40,05\text{mV}$ ). ..	52
Figura 26: Representação da curva de calibração e da curva de adição padrão (SPCE)....	54
Figura 27: Voltograma do permanganato para a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (GCE). ..	55
Figura 28: Resultados de peróxido de hidrogénio com célula clássica. ....	56
Figura 29: Resultados de permanganato de potássio com célula clássica. ....	57
Figura 30: Voltograma da CIP no primeiro ensaio realizado (tempo decorrido=5min).....	58
Figura 31: Voltamograma obtido no ensaio realizado no solo .....	59
Figura 32: Resultado do ensaio realizado com aplicação em areia. ....	60
Figura 33: Representação da evolução da $i_p$ em função do tempo de reacção decorrido... 61	

## Índice de tabelas

Tabela 1: Estatística do medicamento de 2007. (Fonte: Infarmed).....	10
Tabela 2: Número de embalagens dos antibióticos mais vendidos em 2007 em Portugal. (Fonte: Infarmed).....	11
Tabela 3: Exemplos de estudos já realizados com CIP (2000-2008). .....	13
Tabela 4: Preparação das soluções tampão Britton-Robinson ( $I=0,3$ mol/L). Volumes de soluções de NaOH e $KNO_3$ adicionados a 25,00mL de solução ácida, seguida de diluição até 100,0mL. ....	35
Tabela 5: Valores óptimos dos parâmetros da SWV.....	44
Tabela 6: Características da curva de calibração para análise da CIP por SWV (pH=3,04; $f=400$ Hz; $\Delta E_S=6,00$ mV; $\Delta E_P=40,05$ mV) (GCE).....	47
Tabela 7: Avaliação da precisão para a análise da CIP por SWV (GCE). ....	48
Tabela 8: Características da curva de calibração para análise da CIP por SWV (pH=3,04; $f=400$ Hz; $\Delta E_S=6,00$ mV; $\Delta E_P=40,05$ mV) (SPCE). ....	51
Tabela 9: Avaliação da precisão para a análise da CIP por SWV (SPCE).....	52
Tabela 10: Resposta da CIP usando a mesma célula (SPCE) em ensaios sucessivos para uma dada concentração.....	53
Tabela 11: Condições experimentais do primeiro ensaio com célula clássica. ....	58
Tabela 12: Ensaio realizado em areia adicionando-se permanganato. ....	60
Tabela 15: Composição das soluções para a preparação das soluções tampão de Britton-Robinson.....	71
Tabela 16: $E_P$ e $i_P$ média para cada pH. ....	72
Tabela 17: $i_P$ da CIP para cada valor de $f$ . ....	73
Tabela 18: $i_P$ da CIP obtidas para cada valor de $\Delta E_S$ .....	75
Tabela 19: $i_P$ da CIP obtidas para cada valor de $\Delta E_P$ .....	76
Tabela 20: Resultados obtidos da linearidade da CIP por célula clássica. ....	77
Tabela 21: Cálculo do limite de detecção e de quantificação por célula clássica. ....	79
Tabela 22: Resultados da repetibilidade e precisão intermédia por célula clássica. ....	80
Tabela 23: Resultados da curva de adição padrão por GCE.....	80
Tabela 24: Limite detecção e de quantificação por SPCE.....	81
Tabela 25: Resultados da repetibilidade e precisão intermédia por SPCE.....	82
Tabela 26: Resultados da curva de calibração por SPCE.....	83
Tabela 27: Resultados da curva de adição padrão por SPCE.....	83
Tabela 28: Resultados obtidos de $i_P$ da CIP nos ensaios de doseamento. ....	84
Tabela 29: Ensaio realizado com permanganato ( $C_{CIP}=3,0 \times 10^{-5}$ mol/L).....	87
Tabela 30: Ensaio com permanganato ( $C_{CIP}=4,0 \times 10^{-5}$ mol/L). ....	87
Tabela 31: Ensaio realizado com peróxido ( $C_{ciprofloxacina}=3,0 \times 10^{-5}$ mol/L).....	88
Tabela 32: Ficha segurança do antibiótico em estudo, a CIP.....	89

## **Símbolos e Abreviaturas**

CIP - Ciprofloxacina

DPV – Voltametria de Impulso Diferencial

$\Delta E_p$  - Amplitude do impulso de potencial

$\Delta E_s$  - Incremento de potencial

E - Potencial

$E_p$  - Potencial do pico voltamétrico

$f$  - Frequência

FIA – Flow Injection Analysis

GCE - Eléctrodo de Carbono Vítreo (Glassy Carbon Electrode)

$i_p$  - Intensidade de corrente do pico voltamétrico

LOD - Limite de Detecção (Limit of Detection)

LOQ - Limite de Quantificação (Limit of Quantification)

$n$  – número de pontos da curva de calibração

RSD - Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)

SPCE - Eléctrodo de Carbono Impresso (Screen-printed carbon electrodes)

SWV - Voltametria de Onda Quadrada (Square-Wave Voltammetry)

## Análise Voltamétrica da Ciprofloxacina – Aplicação a Medicamentos e a Remediação

$t_p$  - Tempo de duração do impulso

$v$  - Velocidade de varrimento de potencial

## 1. Introdução

Actualmente, a preocupação com a poluição dos solos tem vindo a crescer e cada vez mais se torna uma área de estudo com vista à melhoria da qualidade dos solos portugueses. Até há pouco tempo, apenas se debatia a poluição das águas pois estas estão muito contaminadas com a maior variedade de produtos. Os solos, muitos deles considerados inertes ou inócuos, estavam na realidade contaminados podendo afectar a saúde humana. Hoje em dia, já se realizam análises aos solos com o objectivo de avaliar os que estão contaminados.

A presença de contaminantes no solo não representa apenas um perigo local pois a lixiviação causada pelas chuvas transfere a poluição para os lençóis freáticos, sendo os contaminantes transportados para locais distantes. Isto pode provocar a contaminação, por exemplo, de locais de captação de água de consumo humano ou rega.

No estudo a efectuar pretende-se analisar produtos farmacêuticos. Os fármacos são introduzidos no solo através de águas residuais domésticas, industriais, hospitalares ou também através das fezes dos animais aos quais são administrados antibióticos a fim de evitar que apanhem doenças. Tem-se assistido a uma crescente utilização de medicamentos, o que torna o tema remediação de solos um tema sobre o qual a comunidade científica se tem debruçado no intuito de arranjar técnicas e processos para a sua descontaminação.

Uma razão que pode explicar o estado da contaminação de solos com produtos farmacêuticos é a não existência de legislação para este tipo de contaminante. Assim não há um controle, por parte das entidades emissoras, da libertação destes produtos para o meio ambiente.

Com o objectivo de encontrar uma solução de tratamento de solos contaminados com este tipo de produtos, propôs-se o estudo que se vai realizar, em que se testa a técnica de voltametria de onda quadrada na análise de um fármaco previamente seleccionado. No final do estudo pretende-se determinar se a técnica escolhida é uma boa solução para a monitorização do fármaco, para depois ser possível aplicar a análise em solos contaminados. É escolhida a técnica de voltametria de onda quadrada pois apresenta as vantagens de tempos de análise curtos devido às altas velocidades de varrimento, e de ser uma técnica com elevada sensibilidade.

### 1.1. Estatística de venda de medicamentos

Os grupos de medicamentos que se encontram no ambiente em maior quantidade são os anti-depressivos, antibióticos e os anti inflamatórios. Observando a estatística do medicamento do Infarmed referente a 2007 pode-se visualizar as substâncias activas mais vendidas neste ano em Portugal.

**Tabela 1: Estatística do medicamento de 2007. (Fonte: Infarmed)**

Posição/ Ranking	Substância Activa / Active Substance	PVP / RP	SNS / NHS	Embalagens / Packages
1	Paracetamol / Paracetamol	7 939 109	3 250 187	3 520 490
2	Alprazolam / Alprazolam	15 780 268	6 005 757	2 208 290
3	Sinvastatina / Simvastatin	89 955 033	39 543 128	2 144 523
4	Amoxicilina + Ácido Clavulânico / Amoxicillin + Clavulanic acid	32 074 681	19 070 891	2 091 167
5	Metformina / Metformin	10 741 779	8 168 179	2 011 843
6	Trimetazidina / Trimetazidine	22 557 776	16 698 581	1 992 384
7	Diclofenac / Diclofenac	14 489 815	6 857 040	1 947 175
8	Lorazepam / Lorazepam	5 728 349	2 284 647	1 888 586
9	Indapamida / Indapamide	16 573 059	9 432 667	1 775 043
10	Omeprazol / Omeprazole	77 029 015	58 389 642	1 650 237
11	Ibuprofeno / Ibuprofen	7 066 633	3 673 358	1 633 842
12	Nimesulida / Nimesulide	15 732 187	8 894 498	1 622 152
13	Gliclazida / Gliclazide	13 388 118	12 690 157	1 342 691
14	Bromazepam / Bromazepam	4 485 663	1 993 324	1 207 555
15	Diazepam / Diazepam	2 777 816	1 034 287	1 146 901
16	Furosemida / Furosemide	5 980 848	4 641 981	1 146 044
17	Etinilestradiol + Gestodeno / Ethinylestradiol + Gestodene	7 396 665	4 834 748	1 125 664
18	Acido acetilsalicílico / Acetylsalicylic acid	2 370 635	1 815 191	1 107 377
19	Vacina contra a gripe / Influenza vaccines	8 484 216	3 795 736	1 028 351
20	Bioflavonóides / Flavonoids	20 291 850	4 616 714	1 017 510

Para o trabalho realizado o produto farmacêutico seleccionado foi um antibiótico cuja substância activa é a ciprofloxacina (CIP) sendo esta o terceiro antibiótico mais vendido em 2007 em termos de número de embalagens (Tabela 2).

**Tabela 2: Número de embalagens dos antibióticos mais vendidos em 2007 em Portugal. (Fonte: Infarmed)**

Substância Activa	Embalagens
Amoxicilina+Ácido clavulânico	2091167
Azitromicina	892528
Ciprofloxacina	673604
Amoxicilina	643644
Claritromicina	519168

## 1.2. Antibióticos

Os antibióticos podem ser classificados como substâncias muito dessemelhantes entre si quimicamente, produzidos originalmente pelo metabolismo de certas espécies de fungos (griseofulvina, penicilina), bactérias (polimixina B, bacitracina), *microspora* (gentamicina) e *streptomices* (estreptomicina). A finalidade do antibiótico é combater microorganismos (monocelulares ou pluricelulares), causadores de infecções no organismo [1].

Hoje em dia existem antibióticos contra diversos tipos de doenças como, por exemplo, pneumonia, sífilis, meningite, tuberculose, gonorréia, escarlatina, etc.

Existem vários tipos de antibióticos sendo distribuídos por grupos, de acordo com a sua função. Os grupos são:

- 1) Agentes antimicrobianos – são substâncias que inibem o crescimento de microrganismos ou os destroem. Quando estes agentes são originalmente produzidos por espécies de microrganismos, portanto de origem natural, são denominados antibióticos. Quando são produzidos de forma sintética, denominam-se quimioterápicos.
- 2) Bacteriostáticos – são agentes que inibem o crescimento bacteriano.
- 3) Bactericidas – são agentes que destroem as bactérias [1].

O uso indiscriminado de medicação, principalmente sem orientação e acompanhamento médico, pode ser prejudicial à saúde. O uso excessivo pode levar a que as bactérias desenvolvam capacidade de se defender do efeito do antibiótico, que adquiram resistência aos antibióticos. Assim o antibiótico torna-se menos eficaz no tratamento das doenças [1].

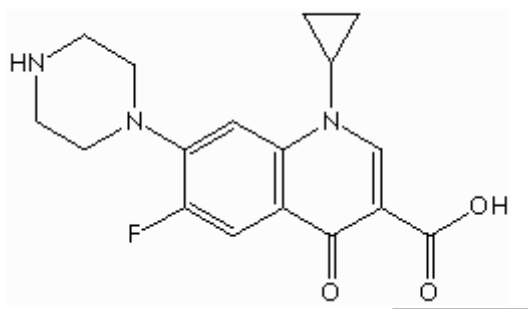
### 1.3. Ciprofloxacina

O antibiótico escolhido para analito do presente trabalho experimental foi a Ciprofloxacina (CIP). Os critérios de selecção basearam-se na relação:

- 1º - Número de vendas
- 2º - Preço do padrão

A CIP é um antibacteriano mais indicado no combate a gastroenterites, infecções arteriais e de pele, infecções ósseas e pneumonias. O nome químico deste antibiótico é 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid. A estrutura química desta substância activa é representada na Figura 1 [2].

Mais características do antibiótico podem ser consultadas na ficha de segurança que se encontra no Anexo III.



**Figura 1: Estrutura química da Ciprofloxacina [2].**

Vários métodos de análise já foram desenvolvidos ao longo dos anos para este antibiótico. Na Tabela 3 apresenta-se alguns exemplos de estudos entre os anos 2000 e 2008.

**Tabela 3: Exemplos de estudos já realizados com CIP (2000-2008).**

<b>Método *</b>	<b>Detector</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
LC	UV	0.03 µg/g	0.11 µg/g	Comida de bebê	[3]
		20 ng/ml (FD) e 100 ng/ml (UVD) no soro e 1 µg/ml na urina		Soro humano e urina	[4]
				Urina	[5]
	MS	0,1 µg /Kg		Ovos	[6]
		4 ng/L	6 ng/L	Águas de rio e águas de esgoto	[7]
		2 ng/g	7 ng/g	Leite bovino	[8]
				Estrumes de porcos, perus e galinhas e em solos na Áustria	[9]
		7 pg/mL	29 pg/mL	Águas	[10]
	(1)			Urina	[11]
	(1)	10 ng/mL	44 ng/mL	Preparações farmacêuticas	[12]
	FD	20 ng/ml (FD) e 100 ng/ml (UVD) no soro e 1 µg/ml na urina		Soro humano e urina	[4]
				Leite bovino e plasma bovino	[13]
		41 ng/mL		Plasma humano	[14]
		5 ng/g		Salmão	[15]

		25 ng/L		Águas residuais hospitalares	[16]
		1 µg/L	9 µg/L	Leite	[17]
		0,1 ng/g	1 ng/g	Camarão	[18]
				Peixe-gato, salmão e camarão	[19]
CE	CL	$2,3 \times 10^{-7}$ mol/L		Urina	[20]
	MS			Leite bovino	[21]
CL		$4,0 \times 10^{-9}$ g/mL		Preparações farmacêuticas e fluidos biológicos	[22]
		$4,40 \times 10^{-9}$ mol/L		Comprimidos, urina e soro humano	[23]
AAS		25 ng/mL	400 ng/mL	Preparações farmacêuticas	[24]
MEEKC				Urina	[25]
FD				Solos	[26]
Potenciometria				Preparações farmacêuticas	[27]
SWV	SPCE	$2,13 \times 10^{-6}$ mol/L	$7,09 \times 10^{-6}$ mol/L	Preparações farmacêuticas	(2)

(1) – Não é enunciado o detector utilizado no estudo

(2) – Diz respeito ao estudo em causa.

\*

Legenda: LC – Cromatografia Líquida

UV – Ultravioleta e Visível

MS – Espectrometria de Massa

FD – Fluorescência

CE – Electroforese Capilar

CL – Quimiluminescência

AAS – Espectrofotometria de Absorção Atômica

MEEKC – Cromatografia Electrocinética micelar

Pela análise da tabela verifica-se que apenas num artigo se estuda solos. É uma área ainda pouco aprofundada, daí a escolha da remediação da CIP no solo por oxidação/redução para o trabalho experimental a realizar. Também se pode observar que não foram efectuados estudos recorrendo á voltametria. O método mais utilizado é a cromatografia líquida.

#### **1.4. Voltametria**

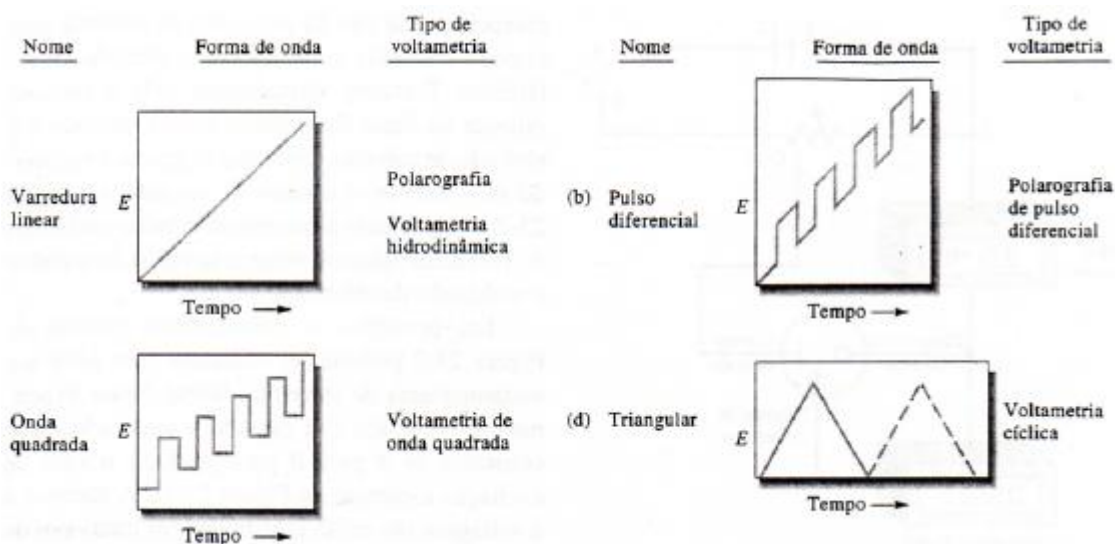
A voltametria nasce no início do ano 1920, por intermédio do químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky, Prémio Nobel de Química em 1959, sendo o primeiro tipo de voltametria designado de polarografia [29].

Os métodos voltamétricos fazem parte do grupo de métodos electroanalíticos, onde é medida a intensidade de corrente em função do potencial aplicado a uma célula electroquímica. Neste método o objectivo é favorecer a polarização do eléctrodo, sendo possível aumentar essa polarização usando as características mais indicadas para o eléctrodo de trabalho. Devem-se usar eléctrodos pequenos com áreas superficiais muito pequenas (na ordem dos milímetros quadrados) é o mais aconselhado [28].

Durante o processamento da técnica, ocorre um fenómeno de transferência de massa do analito para a superfície do eléctrodo. Essa velocidade de transferência de massa vai limitar por sua vez a velocidade de oxidação ou redução do analito em estudo.

A voltametria tem diversas aplicações empregues por químicos, bioquímicos e físico-químicos como por exemplo no estudo de processos de oxidação/redução, processos de adsorção e mecanismos de transferência de electrões em superfícies modificadas de eléctrodos.

Devido ao facto do potencial no eléctrodo de trabalho variar com o tempo, surge o termo sinais de excitação, que são nada mais do que funções potencial-tempo representando a variação do potencial ao longo do tempo. A figura seguinte representa as formas dos sinais de excitação mais comuns em voltametria, assim como o tipo de voltametria associado a cada sinal.



**Figura 2: Sinais de excitação empregados em voltametria [28].**

Num sistema voltamétrico a célula electroquímica é constituída por dois ou três eléctrodos, sendo mais usual a utilização de três eléctrodos. Estes eléctrodos estão mergulhados na solução que contém o analito e um electrólito não reactivo designado de electrólito de suporte (é um sal que é adicionado em excesso à solução do analito). Um dos eléctrodos usados é o eléctrodo de trabalho cujo potencial varia de diferentes formas com o tempo, dependendo do tipo de voltametria usada (Figura 2). O material utilizado para a área activa do eléctrodo pode ser, entre outros, carbono, ouro e platina. O potencial do eléctrodo de referência permanece constante durante o trabalho. O terceiro eléctrodo é chamado de eléctrodo auxiliar que normalmente é de platina ou de carbono vítreo. O analito é oxidado ou reduzido no eléctrodo de trabalho. Enquanto que o potencial entre este eléctrodo e o eléctrodo de referência é controlado, no caso da corrente esta flui entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar.

O transporte que ocorre, do reagente para a superfície do eléctrodo, é realizado devido a três mecanismos: migração sob a influência de um campo eléctrico, convecção resultante da agitação, difusão devido à diferença de concentração entre o seio da solução e a superfície do eléctrodo. O electrólito de suporte inerte é adicionado tendo em vista reduzir o efeito de migração. Análises estáticas são utilizadas para a redução da convecção [28].

Uma possível interferência nas medições que são efectuadas é a presença de oxigénio. É aconselhável primeiramente efectuar o desarejamento da solução, borbulhando um gás inerte de elevada pureza (normalmente é azoto). Durante a experiência o gás é mantido acima da superfície da solução a fim de evitar a reentrada de

oxigénio. No entanto este tipo de voltametria também permite realizar experiências onde se pretende determinar oxigénio dissolvido em soluções.

#### **1.4.1. Voltametria Hidrodinâmica**

Este tipo de voltametria pode ser realizada de duas formas. Por um lado, pode-se fazer a agitação vigorosa da solução enquanto esta está em contacto com um eléctrodo fixo, ou pode-se fazer-se girar o eléctrodo a uma velocidade constante. Por outro, a solução que contém o analito pode fluir através de um tubo onde está montado o eléctrodo de trabalho. Esta ultima forma de proceder tem sido aplicado a casos em que se pretende detectar analitos oxidáveis ou reduzíveis á medida que estes deixam uma coluna de cromatografia líquida ou um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

Quanto á utilização da voltametria hidrodinâmica, esta também pode ser usada na determinação de oxigénio e certas espécies como glicose e sacarose; estudos de processos electroquímicos; detecção de pontos finais de titulações voltamétricas. Este ultimo caso apenas se aplica se pelo menos um dos reagentes ou produtos de reacção seja oxidado ou reduzido no eléctrodo de trabalho [28].

#### **1.4.2. Polarografia de varrimento linear**

Este tipo de voltametria difere da voltametria hidrodinâmica em alguns aspectos. Por exemplo, na polarografia de varredura linear a transferência de massa do analito para o eléctrodo não se processa essencialmente devido aos mecanismos de convecção e de migração mas sim devido á difusão. Outra diferença é o eléctrodo de trabalho utilizado, que nesta técnica é um eléctrodo de mercúrio gotejante [28].

Quando se está a trabalhar com o eléctrodo de mercúrio gotejante, a corrente sofre variações que correspondem á velocidade de formação da gota de mercúrio. À medida que uma gota de mercúrio se solta do capilar a corrente cai para o valor zero. O aumento da corrente é favorecido pelo aumento da área superficial das novas gotas que se vão formando. A utilização deste tipo de eléctrodo apresenta algumas vantagens assim como contrapartidas, que são analisadas de seguida [29].

Como vantagens, pode-se enunciar o facto de que neste tipo de eléctrodo pode-se gerar novas superfícies metálicas continuamente independentemente do seu histórico. Outra característica vantajosa é que com este tipo de eléctrodo facilmente se obtém a

reprodução de correntes, independentemente se a reprodução é alcançada a partir de valores altos ou baixos.

A facilidade de oxidação do mercúrio é uma contrapartida para o uso do eléctrodo gotejante. Uma possível contrapartida com o uso deste tipo de eléctrodo é o entupimento do capilar o que provoca o mau funcionamento do método. Devido às desvantagens enunciadas e à toxicidade do mercúrio, podendo provocar problemas na saúde humana assim como no ambiente, este tipo de eléctrodo tem sido sucessivamente afastado da voltametria [28].

Assim conclui-se que a polarografia de varredura linear não é dos melhores métodos para usar pois apresenta baixa sensibilidade na ordem de  $10^{-5}$  mol/L e alguns inconvenientes com o equipamento usado.

Com o aparecimento dos métodos de impulso, as limitações da polarografia de varredura linear foram compensadas. Dentro dos métodos de voltametria de impulso temos a voltametria de impulso diferencial e a voltametria de onda quadrada.

### 1.4.3. Voltametria de impulso diferencial (DPV)

Neste tipo de voltametria os sinais de excitação podem ser diferentes, consoante o tipo de equipamento usado. Na figura seguinte ilustra-se os sinais de excitação mais comuns na voltametria de impulso diferencial.

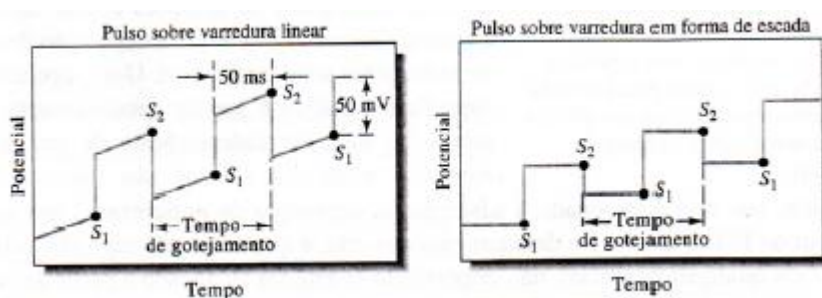
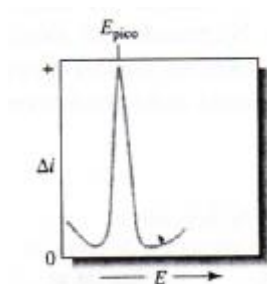


Figura 3: Sinais de excitação para a voltametria diferencial [28].

Duas medidas de corrente são aplicadas alternadamente. Uma é aplicada em  $S_1$  antes aplicação do impulso e a outra em  $S_2$  após o final do impulso. Depois a diferença de corrente por impulso  $\Delta i$  é registada em função do potencial, resultando a curva diferencial que se apresenta na figura seguinte.



**Figura 4: Voltograma obtido por DPV [28].**

A altura do pico obtido na curva em certas condições é directamente proporcional à concentração.

Uma vantagem da voltametria de impulso diferencial é a sua maior sensibilidade comparativamente com a polarografia de varredura linear. Este tipo de voltametria também apresenta limites de detecção mais baixos, na ordem dos  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  mol/L [28].

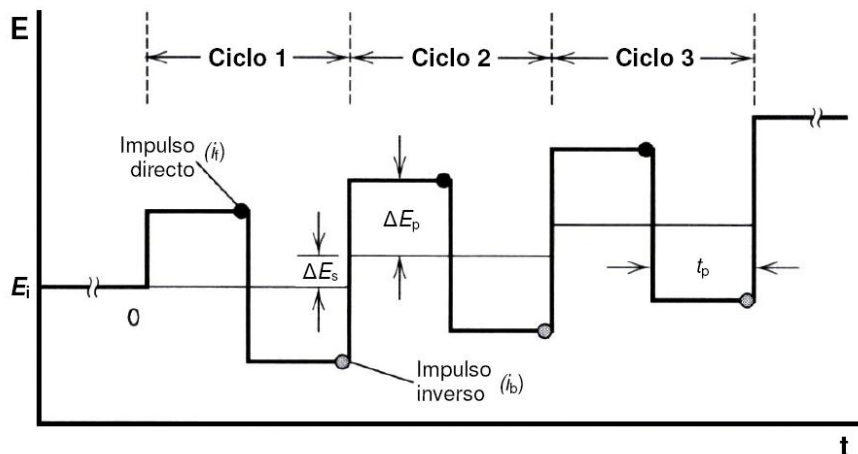
#### 1.4.4. Voltametria de onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada (SWV) também é possível usar o eléctrodo de mercúrio gotejante, onde a varredura é feita nos últimos milissegundos de vida da gota de mercúrio quando a corrente de carga é essencialmente constante. No entanto este tipo de voltametria também tem sido realizado com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa ou com eléctrodo de carbono.

A velocidade de varrimento de potencial ( $v$ ) é obtida através da expressão  $v=f \times \Delta E_s$ , sendo  $f$  a frequência dos ciclos. A frequência dos ciclos pode ser calculada através da

expressão  $f = \frac{1}{2} \times t_p$ , onde  $t_p$  representa o tempo de duração do impulso. Este tempo

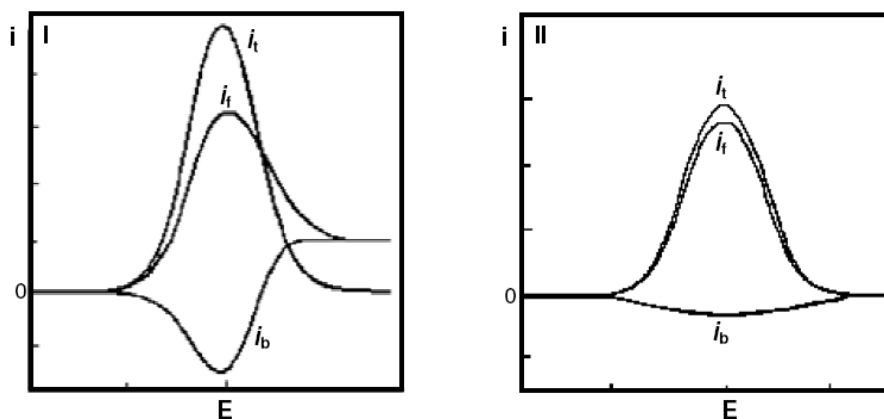
define o tempo de análise e o incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) fixa o afastamento dos pontos de medição. O sinal analítico é mais influenciado pela amplitude do impulso de potencial ( $\Delta E_p$ ) do que pelo incremento de potencial. Na Figura 5 representa-se um exemplo de esquema de aplicação do potencial ( $E$ ) e medição da intensidade de corrente ao longo do tempo nesta técnica [28].



**Figura 5: Esquema de aplicação do potencial e medição da intensidade de corrente ao longo do tempo na voltametria de onda quadrada [29].**

O sinal de excitação nesta técnica é obtido através da sobreposição da sequência de impulsos com o sinal na forma de escada. A medida da corrente na SWV é feita duas vezes em cada ciclo, uma vez no fim do impulso directo ( $i_f$ ) e outra no fim do impulso inverso ( $i_b$ ). Pode-se depois representar graficamente a intensidade de corrente total  $i_t$  ( $i_f - i_b$ ) [29].

Este tipo de voltametria apresenta como vantagem a sua elevada sensibilidade. Os limites de detecção situam-se na ordem dos  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  mol/L. Outra vantagem desta técnica são as altas velocidades de varrimento nas análises, o que leva a curtos tempos de análise e gradientes de concentração maiores dos que são encontrados na maioria das restantes técnicas voltamétricas. [28].



**Figura 6: Voltamograma teórico associado a SWV para um sistema reversível [30].**

Esta técnica tem várias utilizações, uma das quais tem vindo sucessivamente a ser mais utilizada, que é a análise de espécies orgânicas e inorgânicas. Também pode ser aplicada como método de detecção em cromatografia líquida e FIA.

#### 1.4.5. Voltametria cíclica

Nesta técnica de voltametria, parte-se de um determinado potencial e faz-se o varrimento de uma determinada gama de potenciais. Depois inverte-se o sentido, ou seja, efectua-se o varrimento no sentido inverso da mesma gama de potenciais. O ponto de partida e de chegada são o mesmo. Na Figura 7 pode-se verificar o que se acaba de enunciar. Durante a experiência o eléctrodo é mantido numa solução (onde está contido o analito) em repouso. A corrente é excitada na forma triangular obtendo-se o tipo de gráfico representado na figura seguinte.

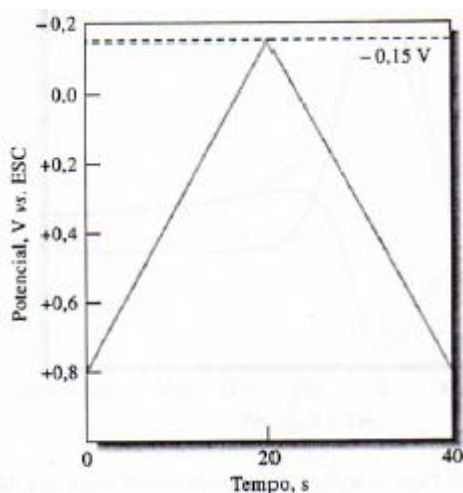


Figura 7: Sinal de excitação em voltametria cíclica [28].

Os potenciais onde ocorre a reversão são designados de potenciais de inversão. Estes potenciais são escolhidos de forma a observar a oxidação ou a redução.

Os parâmetros mais importantes num voltograma desta técnica são os potenciais de pico catódico e anódico e as intensidades de corrente do pico catódico e anódico.

A principal aplicação deste tipo de técnica é na análise qualitativa de processos electroquímicos.

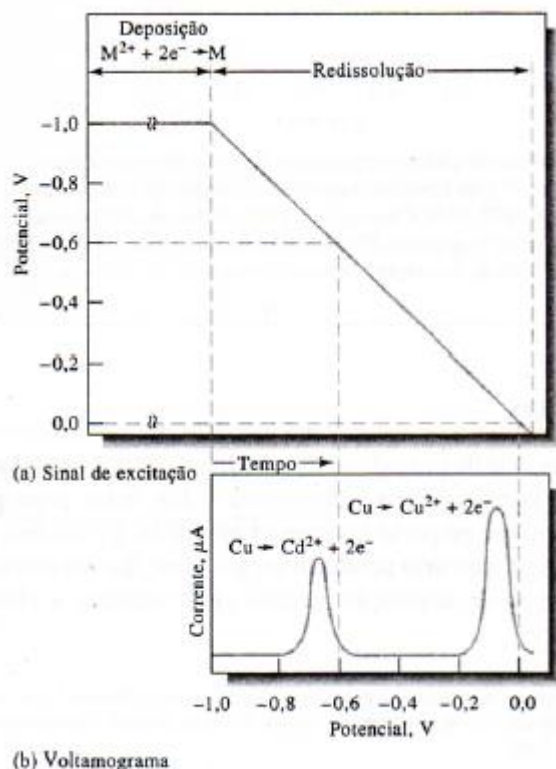
#### 1.4.6. Métodos de redissolução

Não sendo propriamente um tipo de voltametria, os métodos de redissolução abrangem uma variedade de procedimentos electroquímicos nos quais a voltametria está presente. Os métodos de redissolução englobam duas fases. A primeira fase diz respeito a uma pré-concentração quantitativa, seguindo a fase de análise por um dos métodos voltamétricos enunciados anteriormente.

Começa-se por adicionar o analito à solução que se encontra sob agitação. O analito vai-se depositando no eléctrodo sendo depois determinado por um método voltamétrico. Durante esta segunda etapa, o analito é redissolvido ou retirado do eléctrodo de trabalho.

Existe três tipos de redissolução. Um dos métodos é a redissolução catódica, onde durante a etapa de deposição o eléctrodo de trabalho funciona como um ânodo e na etapa de redissolução funciona como um cátodo. A redissolução anódica é precisamente o contrário, ou seja, o eléctrodo funciona como um cátodo na deposição e como um ânodo na redissolução. O terceiro método de redissolução é a adsortiva, onde a deposição do analito se dá por adsorção física na superfície do eléctrodo e não pela deposição electrolítica dos métodos anteriores.

A Figura 8 mostra um exemplo de sinal de excitação para métodos de redissolução. Diz respeito a uma redissolução anódica para a determinação de cobre e cádmio. O método voltamétrico usado é polarografia de varredura linear.



**Figura 8: Sinal de excitação e respectivo voltagrama de redissolução anódica [28].**

Os eléctrodos mais usados nesta técnica são o de mercúrio de gota suspensa e o de filme de mercúrio. No caso do filme de mercúrio, o filme é depositado sobre um disco de, por exemplo, carbono. Este tipo de eléctrodo tem uma área menor que o eléctrodo de gota suspensa, o que permite obter resultados com maior sensibilidade. Outra vantagem do eléctrodo de filme é que produz picos mais estreitos no voltagrama. Por outro lado, o eléctrodo de gota suspensa gera resultados mais reprodutíveis especialmente para concentrações mais elevadas de analito.

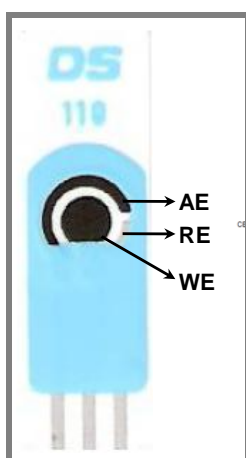
Os métodos de redissolução são métodos simples e rápidos, o que é uma vantagem a ter em conta aquando da escolha da técnica que se quer usar. Estes métodos permitem a determinação de analitos que estejam em quantidades muito baixas em solução. Pode-se determinar compostos na ordem dos  $10^{-9}$  –  $10^{-11}$  mol/L. Os métodos de redissolução catódica têm sido muito aplicados na determinação de haletos. Já a redissolução adsortiva, é usada na determinação de cátions inorgânicos e compostos orgânicos que estão em concentração reduzida na solução [28].

### 1.5. Eléctrodos de carbono impresso

Os eléctrodos de carbono impresso (SPCE), também conhecidos como screen-printed carbon electrodes, são dispositivos planares baseados em diferentes camadas de tinta impressa em substratos, substratos esses que podem ser de plástico, vidro ou cerâmica. Estes dispositivos constituem um tipo de célula usada em voltametria. São constituídas, da mesma forma que as células de análise clássicas, por três eléctrodos: referência, auxiliar e de trabalho [31].

Vários tipos de materiais são usados na construção dos eléctrodos, sendo que os mais usados são o carbono e metais nobres, como por exemplo, a prata, ouro e platina. O tipo de material de construção influencia o comportamento electroquímico do sensor [31].

As vantagens deste tipo de dispositivo são a sua facilidade de operação, a sua portabilidade devido ao seu reduzido tamanho, a sua elevada fiabilidade nos resultados obtidos, facilidade de mudança de eléctrodo, baixo custo da célula (cada célula custa 1.50-2€), permite uma redução do consumo de amostra pois o volume de amostra adicionada à célula para análise é cerca de 50 $\mu$ L [31].



**Figura 9: Representação de uma célula de electrodo de carbono impresso.**  
(WE- electrodo de trabalho; RE – electrodo de referência; AE – electrodo auxiliar)

### **1.6. Validação de métodos analíticos**

A validação de um método analítico tem como objectivo determinar se o método em estudo é adequado para a finalidade pretendida.

Os parâmetros a validar e o procedimento a seguir dependem do tipo de análise e dos objectivos pretendidos pelo analista. Os principais parâmetros para avaliar o desempenho do método desenvolvido devem ser: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exactidão e selectividade.

#### **1.6.1. Linearidade**

A linearidade de um método analítico é a zona em que a resposta do analito varia linearmente com a quantidade de analito. Analisa-se a resposta do analito em função de concentrações crescentes do mesmo. Para tal, a partir de um número mínimo de cinco padrões constrói-se uma curva de calibração através de regressão linear.

#### **1.6.2. Limites de detecção e de quantificação**

O limite de detecção é a quantidade mínima do analito detectada pelo método em estudo. O limite de quantificação diz respeito á menor concentração do analito quantificada com precisão pelo método. Pode-se enunciar uma forma de calcular estes dois limites [32].

$$LOD = \frac{3 \times S_{Y/X}}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{Y/X}}{b}$$

Sendo que  $S_{Y/X}$  representa a estimativa dos erros aleatórios na direcção do eixo dos yy e b representa o declive da curva de calibração.

### 1.6.3. Precisão

Um parâmetro que pode ser usado para avaliar a precisão é o desvio padrão relativo, sendo calculado através da expressão  $RSD(\%) = \frac{\sigma}{x} \times 100$ , onde  $\sigma$  representa o desvio padrão e  $x$  a média aritmética das medições.

A precisão é avaliada pela repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. A repetibilidade consiste em realizar ensaios considerando sempre as mesmas condições experimentais. A precisão intermédia consiste em efectuar ensaios em dias diferentes mantendo as restantes condições dos ensaios. Na reprodutibilidade utiliza-se o mesmo método e amostras iguais mas realiza-se ensaios em diferentes condições.

### 1.6.4. Exactidão

A exactidão avalia, na zona linear do método analítico seleccionado, a proximidade entre os valores obtidos experimentalmente e o valor real, ou assumido como tal. Este parâmetro pode ser avaliado através da adição de uma amostra farmacêutica da substância activa em estudo.

### 1.6.5. Selectividade

A selectividade de um método é avaliada pela sua capacidade de distinguir o analito em estudo de outras substâncias que poderão estar presentes na amostra. Deste modo, na avaliação da selectividade de um método para a análise de uma substância activa numa formulação farmacêutica, a influência dos excipientes presentes deve ser avaliada através do procedimento da secção anterior

## 1.7. Remediação de contaminantes

Nas últimas décadas, diversas técnicas de remediação têm sido aplicadas no tratamento de solos contaminados com produtos farmacêuticos. Vários estudos foram realizados usando técnicas como a ozonização, a oxidação ou a bioremediação. Para prevenir/tratar doenças dos animais são-lhes administradas doses consideráveis de fármacos. Uma parte destes fármacos é posteriormente expelida nas fezes dos animais

que serve, muitas vezes, de adubo em solos para actividade agrícola. Deste modo o fármaco é transferido para o solo resultando na contaminação deste podendo esta ser transferida posteriormente para o ser humano por via da água de consumo ou de rega.

O modo como os contaminantes se movimentam nos solos foi estudado em Premasis Sukul [33], onde se analisa o processo de adsorção/desadsorção da sulfadiazina no solo. A quantificação da sulfadiazina foi realizada recorrendo á técnica de cromatografia de alta eficiência. Os resultados sugerem que a adição de matéria orgânica ao solo, reduz posteriormente a contaminação da água por parte do solo contaminado com sulfadiazina. É provado no estudo o potencial de contaminação da sulfadiazina, sendo por isso um composto com necessidade de tratamento antes de ser libertado para os solos.

A técnica de ozonização como demonstram alguns estudos, já foi utilizada para a destruição de antibióticos. Os artigos encontrados, não enunciam a aplicação desta técnica em solos, no entanto se esta técnica é eficaz na destruição de compostos que não em solos, também poderá ser capaz de tratar antibióticos existentes em solos. Porém, pode não ser tão eficaz como outras técnicas que já foram aplicadas neste tipo de contaminante em solos.

O estudo realizado por Franziska Lange [34], diz respeito a ensaios realizados para estudar a inactivação e eliminação do antibiótico, claritromicina, por reacção com o ozono. Deste estudo conclui-se que em efluentes líquidos a ozonização é um bom método de inactivação ou eliminação de antibióticos, como é o caso da claritromicina, devido à grande reacção que existe entre o ozono e o antibiótico. Em Bavo De Witte [35] estuda-se os efeitos da ozonização na concentração de ciprofloxacina. Posteriormente um produto de degradação da ciprofloxacina, o desetileno, é identificado por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando a espectrometria de massa como detector. Os principais resultados demonstram que a ciprofloxacina é degradada mais rapidamente a pH 3 e com as maiores concentrações de ozono testadas. A adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogénio favorece a degradação da ciprofloxacina.

Também existem artigos publicados onde se faz o estudo da ozonização em estrumes de animais, como por exemplo em Merih Otker Uslu [36], em que se realiza o estudo da eficiência da ozonização na degradação do antibiótico oxitetraciclina em estrumes e num efluente líquido sintético. A taxa de degradação depende do pH e da concentração de ozono aplicada. Conclui-se que o ozono não é muito eficiente na degradação do oxitetraciclina, quando presente em estrumes, mas pode ser eficiente no tratamento de efluentes líquidos contaminados com oxitetraciclina. Uma razão que pode

explicar a baixa eficiência em estrumes, é a presença de altos teores de matéria orgânica nos estrumes. Esta matéria poderá absorver o oxitetraciclina impedindo posteriormente a reacção do contaminante com o ozono.

A técnica de bioremediação tem sido também muito utilizada na remediação de solos contaminados, não só com antibióticos, mas com outros contaminantes. Rahyani Ermawati [37] analisou o comportamento de esteróides hormonais em estrumes pela técnica de bioremediação. Existem também estudos onde se aplica a técnica de bioremediação em compostos petrolíferos (Paul H. Fallgren [38]). Os ensaios foram realizados num reactor de fase sólida onde se obtiveram boas taxas de degradação dos compostos petrolíferos.

Outro exemplo é o estudo de J.K. Adesodun [39], onde se realiza o estudo da viabilidade do uso de dejectos de animais como bioremediação alternativa em solos contaminados com compostos petrolíferos. Este é um método de simples aplicação e de custos reduzidos. Os dejectos utilizados são de bovinos, suínos e de aves domésticas. No final do estudo faz-se uma avaliação dos resultados obtidos, para verificar qual o tipo de dejectos mais eficiente no tratamento dos compostos petrolíferos. Concluiu-se que os dejectos com melhores resultados são os de aves domésticas, seguindo-se os dejectos suínos.

A bioremediação já foi também aplicada em fungicidas, como retrata o estudo Zarhelia Carlo Rojas [40]. Neste estudo enuncia-se um trabalho realizado com o objectivo de estudar a degradação do fungicida clortalonil, presente num solo usado para agricultura, em condições anaeróbias. Os resultados obtidos provam que em condições anaeróbias o clortalonil é degradado, mesmo se este estiver presente em concentrações elevadas. Agustín Ibarrolaza [41] estudou a influência de diferentes concentrações de crómio na eficiência do processo de bioremediação e na composição da comunidade bacteriana presente no solo contaminado com fenantreno. Conclui-se que a presença de crómio retarda a degradação do fenantreno e provoca alterações na estrutura das bactérias presentes no solo.

O método escolhido para o trabalho proposto é a oxidação química. Esta técnica já foi estudada em várias experiências efectuadas, onde são usados diferentes tipos de oxidantes químicos. Exemplo de estudos já realizados aplicando a oxidação, temos em Paula Tereza de Souza e Silva [42] um exemplo da aplicação do reagente de Fenton em tratamento de solos contaminados. Como principais resultados tem-se que é imprescindível otimizar os parâmetros: concentração de peróxido de hidrogénio, concentração de reagente Fenton, pH e o mais importante o tempo de reacção. Os

resultados corroboram que o fenantreno é mais facilmente degradável que o pireno. Este estudo revela que o uso do reagente de Fenton é fiável no processo de oxidação dos compostos fenantreno e pireno.

O cloro também pode ser usado como oxidante químico. Virender K. Sharma [43] estudou o processo de oxidação de medicamentos recorrendo a vários oxidantes como cloro, óxido de cloro, ozono e ferro. Os resultados mostram que a oxidação de fármacos através do ozono ocorre muito rapidamente (tempo meia vida inferior a 100s). Dos oxidantes testados, o  $O_3$  e FeVI apresentam-se como os mais eficientes em processos deste tipo.

Para além de ser possível utilizar oxidantes químicos, já é possível usar processos avançados de oxidação/redução. É o caso de Weihua Song [44], onde a oxidação de antibióticos é feita através de radicais livres. Este método é uma alternativa aos convencionais tratamentos, que muitas vezes não são eficientes. Os radicais testados são o hidroxilo ( $\cdot OH$ ) e o electrão hidratado ( $e^-_{aq}$ ). Os resultados do estudo mostram que o método de utilizar radicais é uma boa alternativa aos métodos de tratamento vulgarmente usados. Conclui-se também que o radical hidroxilo é mais eficiente do que o electrão hidratado.



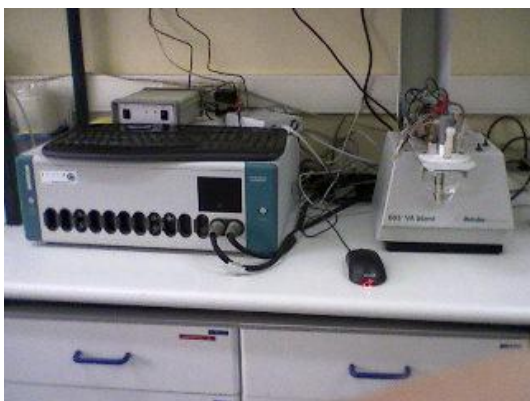
## 2. Condições Experimentais

Nesta secção é descrita a instrumentação utilizada no estudo, assim como os reagentes e soluções necessários para a execução do trabalho. A seguir enuncia-se os procedimentos experimentais adoptados nas várias fases do estudo.

### 2.1. Instrumentação

Os ensaios voltamétricos foram efectuados utilizando um AUTOLAB potenciostato/galvanostato de modelo PGSTAT12 da marca Metrohm que é controlado por um sistema de aquisição e tratamento de dados GPES 4.9. O AUTOLAB encontra-se acoplado a um stand voltamétrico Metrohm 663VA, o qual possui uma célula voltamétrica constituída por três eléctrodos da marca Metrohm (Figura 10), de seguida designada por célula clássica.

Relativamente ao tipo de eléctrodos utilizados na célula clássica, o eléctrodo de trabalho (Figura 11) foi de carbono vítreo ( $d=2\text{mm}$ ), enquanto que o eléctrodo referência foi de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl } 3\text{mol/L}$  (Figura 12). O eléctrodo auxiliar foi também de carbono vítreo (Figura 13).



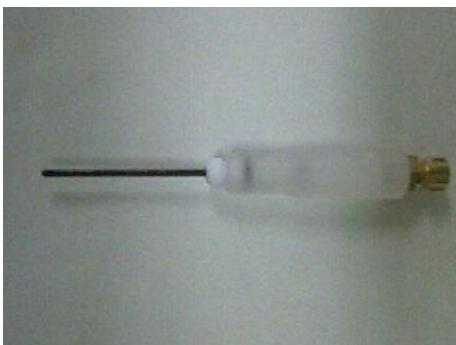
**Figura 10: Equipamento utilizado nos ensaios voltamétricos.**



**Figura 11: Eléctrodo de trabalho (GCE) utilizado na célula clássica.**



**Figura 12: Eléctrodo de referência (Ag/AgCl/KCl 3mol/L) utilizado na célula clássica.**



**Figura 13: Eléctrodo auxiliar (carbono vítreo) utilizado na célula clássica.**

A Figura 14 representa mais pormenorizada a célula voltamétrica clássica usada. A amostra é introduzida na célula, onde são colocados os eléctrodos que estão previamente fixados nos seus respectivos lugares. Após a introdução da amostra, aplica-

se um varrimento de potencial e ocorre uma transferência de massa do analito para a superfície do eléctrodo de trabalho, ao longo do tempo de ensaio sendo avaliada a intensidade de corrente do sinal analítico de oxidação. O resultado obtido permite determinar em determinadas condições a quantidade do analito. Depois de cada leitura é necessário fazer a limpeza do eléctrodo de trabalho, para retirar os produtos da oxidação do antibiótico em estudo. Esta limpeza efectua-se com óxido de alumínio com recurso a um pedaço de camurça. Faz-se a fricção do eléctrodo na camurça contendo o óxido de alumínio húmido. Depois lava-se o eléctrodo com água desionizada.

Deve-se lavar muito bem a célula electroquímica. Convém no início de cada ensaio efectuar uma leitura do branco para confirmar se obtém resposta da CIP. Caso se obtenha uma ligeira resposta significa que a célula não esta bem lavada.

As células SPCE são adquiridas à DropSens cuja referência é DRP 110. O substrato das células é cerâmica e o eléctrodo de trabalho é de carbono com 4mm de diâmetro. O eléctrodo auxiliar é também de carbono e o eléctrodo de referência é de prata [45]. A amostra é colocada na superfície da célula onde se encontram os eléctrodos. Não é necessário realizar o desarejamento da solução de análise durante a realização dos ensaios. Ao contrário das células clássicas, neste tipo de célula não é necessário efectuar a limpeza do eléctrodo de trabalho pois as células são descartáveis. Na Figura 15 apresenta-se uma imagem representativa das células SPCE.



**Figura 14: Representação da célula voltamétrica clássica.**



**Figura 15: Representação da célula voltamétrica SPCE.**

As pesagens necessárias foram efectuadas numa balança analítica Sartorius de modelo BP211D. As medições de pH realizaram-se num pH-metro da Crison de modelo GLP 22. Na questão de material de medição de líquidos, usou-se pipetas volumétricas, por exemplo de 10,00mL e 20,00mL. Também usou-se provetas graduadas por exemplo de 25mL. Para preparação de soluções foram usados balões volumétricos de 100,00mL e 250,00mL e vários gobelés. O material de vidro é da marca Qualicolor e Normax. Para medir volumes inferiores a 10,00mL recorreu-se a micropipetas da Gilson. A trituração dos comprimidos da formulação farmacêutica foi realizada com recurso a um almofariz.

## **2.2. Reagentes e soluções**

### **2.2.1. Voltametria**

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (condutância  $<0,1\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

Preparou-se uma solução stock de CIP ( $M=331,34\text{ g/mol}$ ), da marca Fluka com uma pureza  $\geq 98\%$ , de concentração  $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ . Para preparar esta solução pesou-se uma massa de 0,0335g do antibiótico que foi dissolvida em 100,0mL de água adicionando-se à solução uma gota de HCl 37%. Todas as soluções de CIP necessárias posteriormente preparam-se a partir desta solução através da sua diluição com água/electrólito de suporte.

Deve-se preparar grande quantidade de solução stock de CIP para evitar preparar demasiadas vezes esta solução ao longo do estudo o que poderia levar a alguma diferença de constituição das várias soluções preparadas.

Relativamente aos ensaios voltamétricos de optimização das condições experimentais, utilizou-se como electrólito de suporte soluções tampão Britton-Robinson ( $I=0,3$  mol/L). Estes preparam-se por adição de NaOH 0,8 mol/L,  $KNO_3$  1,34 mol/L a 25,00mL de uma solução ácida (ácido acético 0,16 mol/L+ácido fosfórico 0,16 mol/L+ácido bórico 0,16 mol/L), perfazendo-se o volume a 100,0mL com água desionizada. No Anexo I apresenta-se a composição das soluções constituintes dos tampões de pH. Na Tabela 4 apresenta-se, para cada valor de pH, as quantidades de NaOH e  $KNO_3$  adicionados a 25,00mL de solução ácida.

Deve-se preparar grandes quantidades de solução tampão do pH óptimo, para evitar preparar demasiadas vezes esta solução ao longo do estudo o que poderia levar a alguma diferença de constituição das várias soluções preparadas.

**Tabela 4: Preparação das soluções tampão Britton-Robinson ( $I=0,3$  mol/L). Volumes de soluções de NaOH e  $KNO_3$  adicionados a 25,00mL de solução ácida, seguida de diluição até 100,0mL.**

pH	$V_{NaOH}$ (mL)	$V_{KNO_3}$ (mL)
1,78	0	21,14
2,30	3,00	20,23
3,04	4,50	19,60
4,06	6,00	18,78
4,96	9,00	16,93
5,88	11,00	15,14
6,75	13,50	12,25
8,17	15,50	10,23
9,29	19,00	8,00
10,24	20,00	7,20

Para a desoxigenação das soluções analisadas usou-se uma corrente de azoto 5.0 obtida através da Linde Sogas.

No estudo da selectividade e no doseamento, a formulação farmacêutica utilizada foi adquirida numa farmácia, sendo a designação de CIPROFLOXACINA 500mg sendo o produtor a Ranbaxy. A embalagem é constituída por 16 comprimidos revestidos por película.

### 2.2.2. Remediação

Inicialmente preparou-se soluções dos oxidantes permanganato de potássio e o peróxido de hidrogénio, ambos de concentração  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L. A solução de permanganato foi preparada a partir de uma solução já existente de concentração 0,020 mol/L. O peróxido de hidrogénio foi preparado a partir de uma solução 30% (m/m) da marca Riedel-de Haën. Preparou-se também uma solução de cloreto de manganês a partir do composto em estado sólido (marca Fluka), para verificar se o manganês tem interferência na resposta da ciprofloxacina.

Nos ensaios de remediação foi monitorizada uma solução onde ocorre reacção entre a CIP e um oxidante. A solução é constituída por CIP, o oxidante em estudo e  $H_2SO_4$  concentrado, sendo as quantidades de cada constituinte da solução variáveis de ensaio para ensaio. A utilização do ácido sulfúrico deve-se ao facto de o oxidante actuar melhor em meio ácido (pH=1). Para a monitorização do processo de remediação é necessária a utilização de uma outra solução, sendo esta preparada com uma determinada quantidade de solução de reacção, solução tampão de pH óptimo e NaOH, sendo as quantidades variáveis ao longo dos ensaios que se realizam.

O  $H_2SO_4$  concentrado (93-97%) usado no ajuste de pH da solução de reacção foi da marca Sigma Aldrich. A solução de hidróxido de sódio usado no ajuste do pH da solução de análise foi preparada a partir do composto no estado sólido da marca Pronalab, sendo a concentração pretendida de 4 mol/L.

Deve-se preparar grandes quantidades de solução dos oxidantes testados solução para evitar preparar demasiadas vezes esta solução ao longo do estudo o que poderia levar a alguma diferença de constituição das várias soluções preparadas.

### **2.3. Procedimentos gerais**

#### **2.3.1. Ensaio voltamétricos**

Para a análise do antibiótico em causa, a CIP, utilizou-se a técnica de SWV. Nos ensaios voltamétricos preliminares, usou-se várias soluções tampão Britton-Robinson. As concentrações da CIP pretendidas nos ensaios são obtidas por diluição das soluções mais concentradas com electrólito de suporte na própria célula electroquímica.

O voltograma correspondente ao branco foi obtido após desoxigenação de 10,00mL de electrólito de suporte. O desarejamento, acompanhado de agitação mecânica da solução, foi realizado com azoto durante um período de tempo de 2min para o caso da célula clássica. Terminado o desarejamento, um voltograma é registado através da aplicação de um varrimento de potencial na direcção anódica. No caso da célula SPCE o ensaio foi realizado através da colocação de 60 $\mu$ L de electrólito de suporte na superfície do eléctrodo de trabalho sendo a solução analisada de imediato, não havendo tempo de desarejamento.

Todos os voltogramas e respectivas condições operacionais são armazenados num computador pessoal.

#### **2.3.2. Estudos preliminares e de optimização**

Nos estudos preliminares e de optimização pretendeu-se estudar a influência de diversos parâmetros experimentais com possível efeito combinatório no sinal analítico.

Nos ensaios realizados com a célula clássica o primeiro parâmetro analisado foi o pH, seguindo-se a frequência, o incremento de potencial e a amplitude do impulso de potencial da onda quadrada, respectivamente.

A optimização tem como objectivo a obtenção da maior intensidade de corrente de pico, melhor precisão e maior selectividade. Os parâmetros seleccionados são de seguida utilizados em todos os ensaios posteriores.

Nos ensaios realizados com as células SPCE, para os parâmetros SWV, usou-se os mesmos valores da célula clássica para poupar nos custos das células. Assim neste caso começou-se com a determinação da linearidade seguindo-se os ensaios de repetibilidade/precisão intermédia.

#### 2.3.4. Validação dos métodos desenvolvidos

De forma a validar os métodos desenvolvidos, determinou-se a zona de linearidade entre a intensidade de corrente do pico e a concentração de CIP, o LOD, o LOQ, a precisão e a selectividade.

A zona de linearidade foi estabelecida através da análise de várias soluções de CIP de diferentes concentrações. Através dos resultados obtidos, determinou-se qual a zona onde o sinal da CIP é linear com a concentração. No estudo da linearidade do método, utilizando a célula clássica, estudou-se uma gama de concentrações de CIP entre  $5,00 \times 10^{-7}$  mol/L e  $2,00 \times 10^{-4}$  mol/L. Com o SPCE estudou-se uma gama de concentrações de CIP entre  $1,00 \times 10^{-7}$  mol/L e  $7,00 \times 10^{-5}$  mol/L.

Quanto à precisão, avaliada a nível da repetibilidade e precisão intermédia, determinou-se para três concentrações de CIP que são abrangidas pela zona linear. Para se avaliar a precisão realizou-se cinco leituras seguidas de cada concentração escolhida (para se avaliar a repetibilidade) em três dias diferentes (para se avaliar a precisão intermédia). No caso da célula clássica as concentrações seleccionadas para se realizar o estudo da repetibilidade e precisão intermédia foram:  $1,00 \times 10^{-5}$ ,  $3,00 \times 10^{-5}$  e  $5,00 \times 10^{-5}$  mol/L. Relativamente às células SPCE as concentrações seleccionadas para se realizar o estudo da repetibilidade e precisão intermédia foram:  $1,00 \times 10^{-5}$ ,  $3,00 \times 10^{-5}$  e  $4,00 \times 10^{-5}$  mol/L.

Nos estudos de selectividade triturou-se 2 comprimidos da formulação farmacêutica correspondendo a uma massa de 1,5540g. Dos comprimidos triturados pesou-se 0,01552g (equivalente a 10mg de CIP), misturou-se com 100,00mL de água e procurou-se extrair o princípio activo com a ajuda de um banho de ultra-sons. Assim ficou-se com uma solução com concentração em CIP de  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L. Um volume de 526,0 $\mu$ L da solução resultante foi adicionado a 10,00mL de solução tampão pH 3,04 que se encontrava na célula voltamétrica clássica, obtendo-se assim uma concentração de CIP de  $1,50 \times 10^{-5}$  mol/L. A solução resultante foi analisada por SWV. Em seguida fez-se adições sucessivas da solução stock de CIP ( $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L), de modo a obter concentrações de CIP (padrão) de  $5,00 \times 10^{-6}$ ,  $1,00 \times 10^{-5}$ ,  $1,50 \times 10^{-5}$ ,  $2,00 \times 10^{-5}$ ,  $2,50 \times 10^{-5}$  mol/L, fazendo-se depois a análise voltamétrica.

Para as SPCE, as soluções a analisar foram previamente preparadas e guardadas em recipientes apropriados. Isto porque neste tipo de célula voltamétrica não é possível efectuar mistura de soluções. As concentrações pretendidas são as mesmas que na célula clássica. Para a preparação das soluções começou-se por adicionar em todos os

balões volumétricos (de 10,00mL) 500µL da solução amostra. De seguida, para obter as concentrações pretendidas, adicionou-se os seguintes volumes da solução stock de CIP ( $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L): 0, 50, 100, 150, 200 e 250µL. Completou-se o volume com solução tampão.

### 2.3.5. Doseamento da ciprofloxacina numa formulação farmacêutica

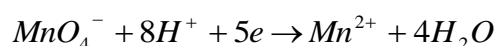
O doseamento da CIP numa formulação farmacêutica (Ciprofloxacina 500 mg – Ranbaxy) foi somente efectuado com o SPCE por proporcionar análises muito mais rápidos quando comparado com a célula clássica.

Neste doseamento triturou-se 2 comprimidos da formulação farmacêutica correspondendo a uma massa de 1,5540g. Dos comprimidos triturados pesou-se 0,01552g (equivalente a 10mg de CIP), misturou-se a massa pesada com 100,0mL de água e procurou-se extrair o princípio activo com a ajuda de um banho de ultra-sons. Da solução resultante preparou-se soluções diluídas de modo que as suas concentrações ( $1,5 \times 10^{-5}$ ;  $2,5 \times 10^{-5}$  e  $3,5 \times 10^{-5}$  mol/L) se situassem dentro dos limites da concentração da curva de calibração ( $1,00 \times 10^{-5}$  –  $4,00 \times 10^{-5}$  mol/L). Estas soluções foram analisadas e com as intensidades de corrente do pico obtidas foi calculado as concentrações de CIP através da interpolação na curva de calibração.

### 2.3.6. Remediação de solos

Começou-se por verificar se os oxidantes a testar e o ião manganês apresentavam sinais de oxidação. Os oxidantes testados foram o permanganato de potássio e o peróxido de hidrogénio. Primeiro teve-se de verificar a obtenção de resposta com os oxidantes em solução aquosa. A possível obtenção de sinal voltamétrico do oxidante pode afectar os resultados aquando da análise do antibiótico. Isto pode levar á sobreposição de picos dos dois compostos.

Quanto ao manganês apesar de não ser um oxidante, foi avaliado da mesma forma a obtenção de resposta porque este composto é um produto da reacção do permanganato.



Como no final da reacção temos manganês em solução, caso se obtenha resposta depois de efectuado o varrimento de potenciais, isto vai afectar os resultados obtidos pois para além de estar a detectar CIP está-se também a detectar manganês.

Na identificação do melhor oxidante foram realizados diversos ensaios com diferentes concentrações de cada oxidante, sendo avaliado o comportamento da  $i_p$  da CIP ao longo de tempo de reacção. A concentração de CIP manteve-se constante em todos os ensaios, sendo de  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L. Os critérios para a selecção do melhor oxidante basearam-se na capacidade de degradação da CIP e o tempo necessário para essa mesma degradação. Pretendia-se um oxidante capaz de degradar totalmente a CIP num curto espaço de tempo.

Para o peróxido de hidrogénio começou-se por utilizar uma concentração deste oxidante de  $7,00 \times 10^{-3}$  mol/L. Verificou-se que este oxidante não consegue degradar a CIP. Então optou-se por não realizar mais ensaios com este oxidante, passando-se para os ensaios com o permanganato de potássio a fim de se verificar se este oxidante era mais eficaz. As concentrações testadas de permanganato de potássio foram:  $1,00 \times 10^{-4}$  mol/L,  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L,  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L e  $7,00 \times 10^{-3}$  mol/L.

Depois de determinado o oxidante mais eficaz na degradação da CIP fez-se a aplicação em solo. Começou-se por pesar 10,0g de um solo previamente seco. Preparou-se uma solução da CIP para adicionar ao solo, para assim se criar um solo contaminado com este composto. É depois adicionado ao solo o oxidante para avaliar se consegue degradar a CIP contida no solo. O meio foi acidificado com  $H_2SO_4$  concentrado. A reacção ocorreu num gobelé. Ao longo do tempo retirou-se amostras, que foram filtradas e corrigido o pH a 3 (pH óptimo) com NaOH 4 mol/L antes de serem analisadas por SWV. O procedimento nos ensaios realizados com areia foi igual ao referido anteriormente para o solo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Optimização (GCE)

O estudo da oxidação da CIP foi realizado pela técnica SWV com uso de uma célula clássica e posteriormente com uma célula SPCE. O sinal da CIP que se obtém foi um pico na zona da gama de potenciais utilizada.

No processo de desenvolvimento da técnica de SWV foi necessário otimizar determinados parâmetros que estão interrelacionados e que podem exercer um efeito combinado no sinal analítico da CIP.

O primeiro parâmetro a otimizar foi o pH. Nesta etapa avaliou-se a resposta da CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L) para diversas soluções tampão de pH numa gama compreendida entre [1,78; 11,91].

Nos ensaios do branco, nalguns tampões, obteve-se um ligeiro pico no mesmo potencial da CIP. A  $i_p$  destes picos teve de ser subtraída à  $i_p$  dos picos da CIP antes de se construir o gráfico  $i_p$  em função do pH.

O pH óptimo corresponde ao pH para o qual a  $i_p$  da CIP é máxima. Os resultados obtidos dos ensaios apresentam-se na Figura 16 e na Tabela 16 (Anexo I).

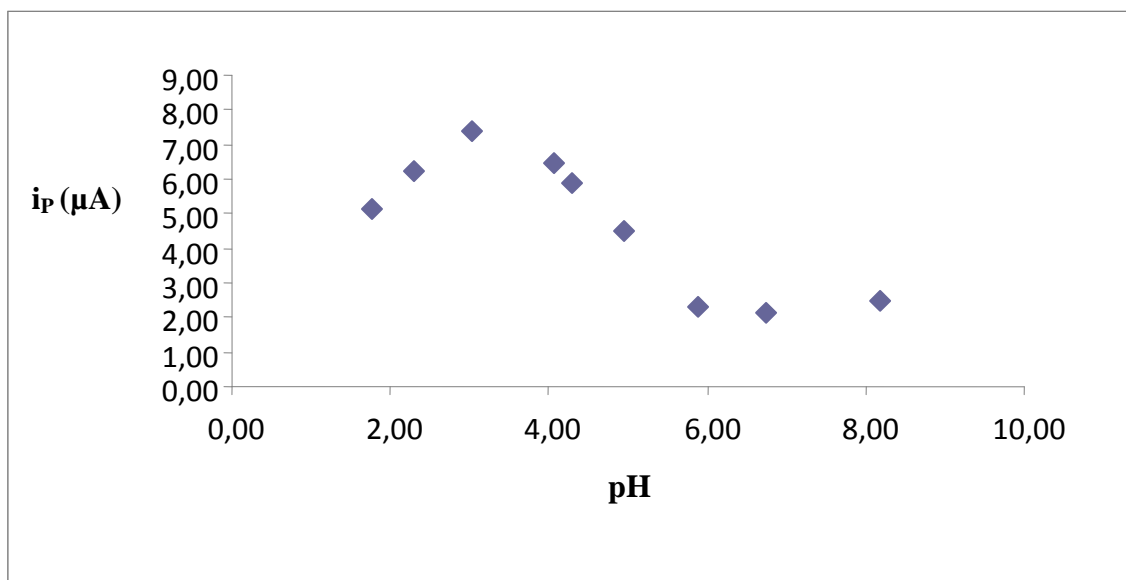
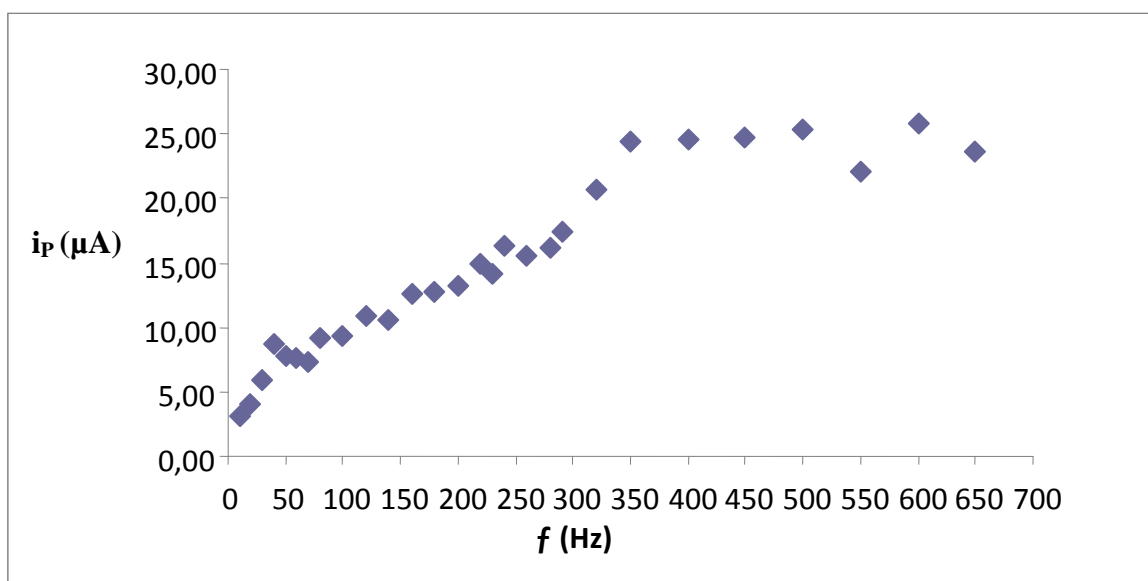


Figura 16: Efeito do pH do electrólito na  $i_p$  de uma solução de CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L) na análise por SWV.

Como se pode observar na Figura 16 a partir do tampão com pH 8,17 a ciprofloxacina deixa de dar resposta. Avaliando a resposta da CIP para os diversos valores de pH, pode-se constatar que esta resposta é maior para o pH 3,04, sendo por isso este o valor de pH óptimo e utilizado nos ensaios seguintes. O  $E_p$  obtido para este valor de pH é de aproximadamente 1,2V.

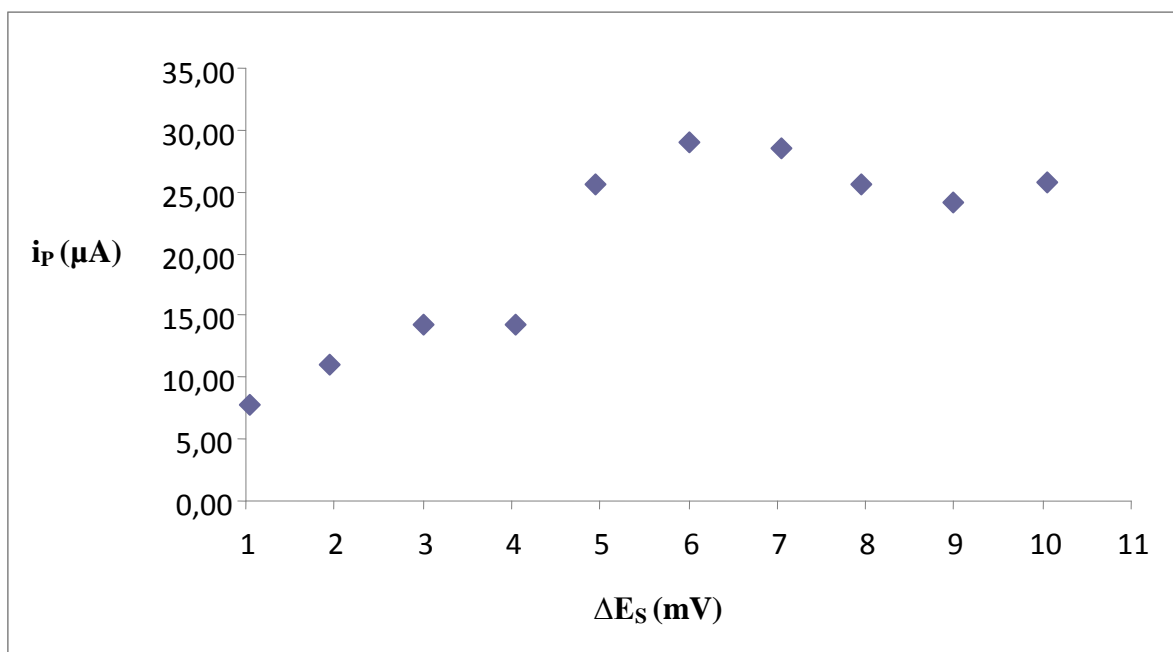
O parâmetro seguinte a testar foi a frequência. Testou-se vários valores de  $f$  no intervalo [10Hz; 650Hz]. Para cada valor deste parâmetro foi determinado a  $i_p$  da CIP  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L Tabela 17 (Anexo I).



**Figura 17: Efeito da frequência na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04).**

Analisando a Figura 17, verifica-se um aumento crescente da  $i_p$  da CIP com o aumento da  $f$  aplicada. Observa-se que a partir de 400Hz a  $i_p$  começa a estabilizar, correspondendo a  $f$  de 400Hz à  $f$  óptima.

Depois de determinada a  $f$  óptima, realizou-se ensaios com o objectivo de determinar qual o melhor  $\Delta E_s$  (Figura 18). Para cada valor deste parâmetro foi determinada a  $i_p$  da CIP  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L sendo utilizado  $\Delta E_s$  de 1 a 10mV (incrementos de 1mV) estando representado na Tabela 18 (Anexo I).



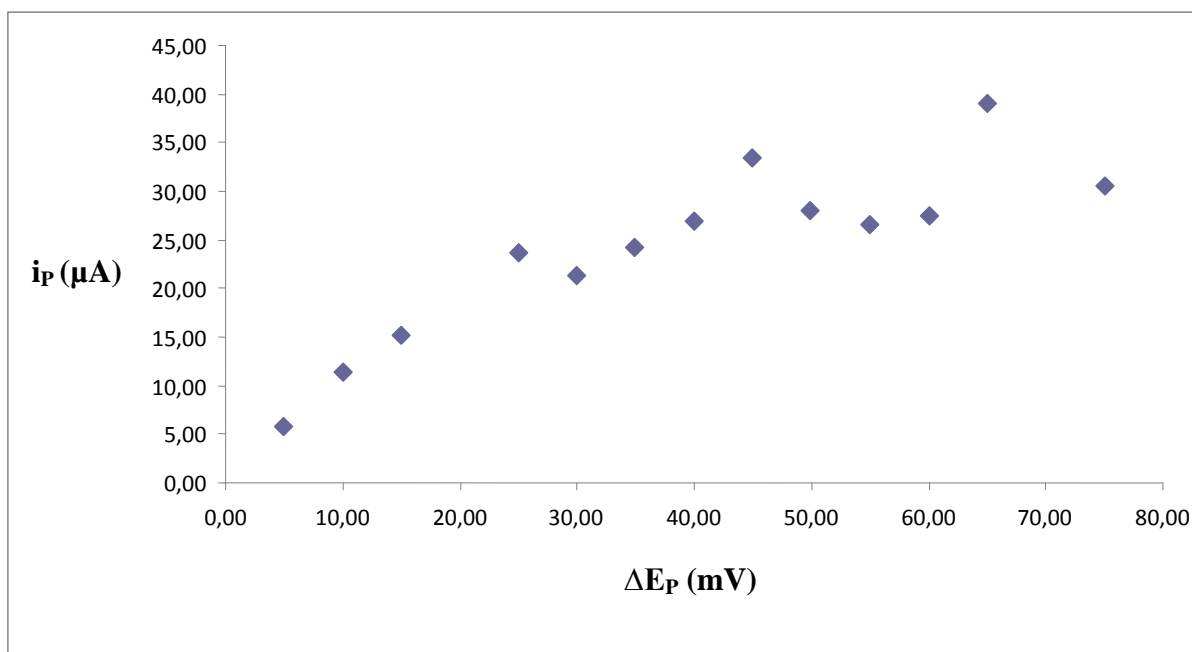
**Figura 18: Efeito do incremento de potencial na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04).**

Pela observação da Figura 18 nota-se uma tendência crescente da  $i_p$  da CIP até ao  $\Delta E_s$  de 6,00 mV, onde se obtém a altura máxima de 29,0 $\mu\text{A}$ , invertendo-se depois a tendência para valores superiores a 6,00mV.

Para o ensaio de 4,05mV a  $i_p$  deu um valor baixo analisando a tendência dos restantes ensaios, provavelmente devido a um erro experimental ou uma ineficaz limpeza do eléctrodo.

O  $\Delta E_s$  óptimo é 6,00mV, pois é para este valor de incremento de potencial que se obtém a resposta máxima da CIP.

O último parâmetro a otimizar foi a amplitude do impulso de potencial,  $\Delta E_p$ . Para determinar a  $\Delta E_p$  óptima fez-se a análise do pico de uma solução de CIP  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, sendo que se pretende o pico mais bem definido, ou seja, o pico mais estreito e mais alto. Os resultados obtidos estão representados na Figura 19 e na Tabela 19 (Anexo I).



**Figura 19: Efeito da amplitude do impulso de potencial na análise por SWV de uma solução CIP ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L) em tampão Britton-Robinson (pH 3,04).**

A partir da  $\Delta E_P$  60,00mV, inclusive, o pico da CIP obtido já é demasiado largo para o método ser considerado selectivo. Por esta razão só foram realizados ensaios até á  $\Delta E_P$  de 75,00mV.

Para o ensaio de 45,00mV obteve-se um valor bastante superior ao dos restantes ensaios, sendo que poderá ter ocorrido algum erro experimental.

O pico da CIP melhor definido foi obtido com o valor de 40,05mV de  $\Delta E_P$  com uma  $i_P$  igual a 26,85 $\mu A$ , correspondendo assim ao  $\Delta E_P$  óptimo.

Na Tabela 5 apresenta-se resumidamente os valores otimizados dos vários parâmetros para a análise da CIP.

**Tabela 5: Valores óptimos dos parâmetros da SWV.**

Parâmetro	Valor
pH	3,04
$f$	400Hz
$\Delta E_S$	6,00mV
$\Delta E_P$	40,05mV

### 3.2. Validação

#### 3.2.1. Eléctrodo de carbono vítreo (GCE)

De modo a encontrar-se a relação linear entre a  $i_p$  e a concentração da CIP, analisou-se soluções com concentrações entre  $5,00 \times 10^{-7}$  e  $2,00 \times 10^{-4}$  mol/L de CIP. Os resultados obtidos são indicados na Tabela 20 (Anexo I) e na Figura 20.

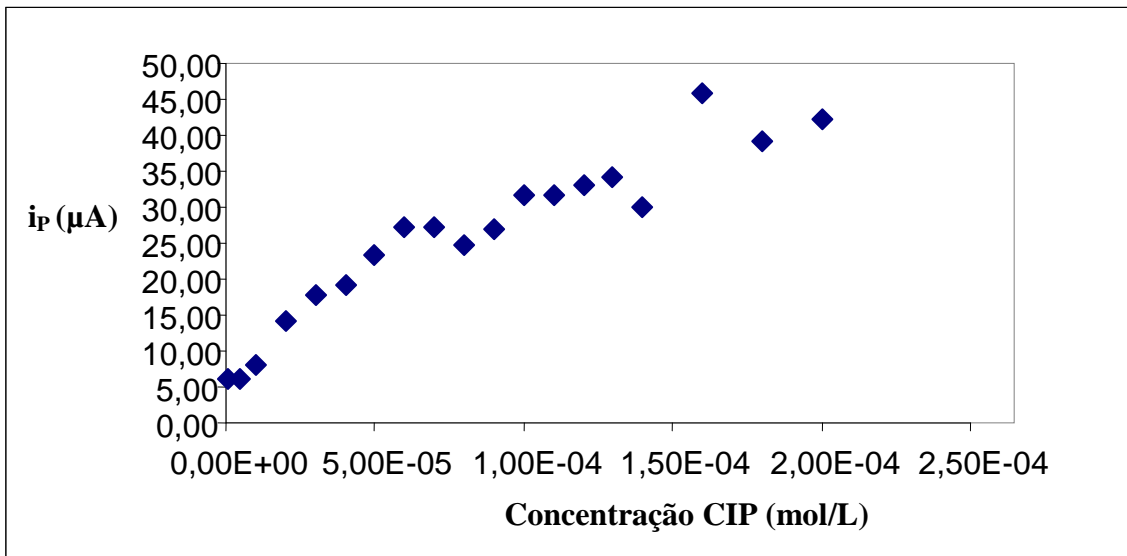
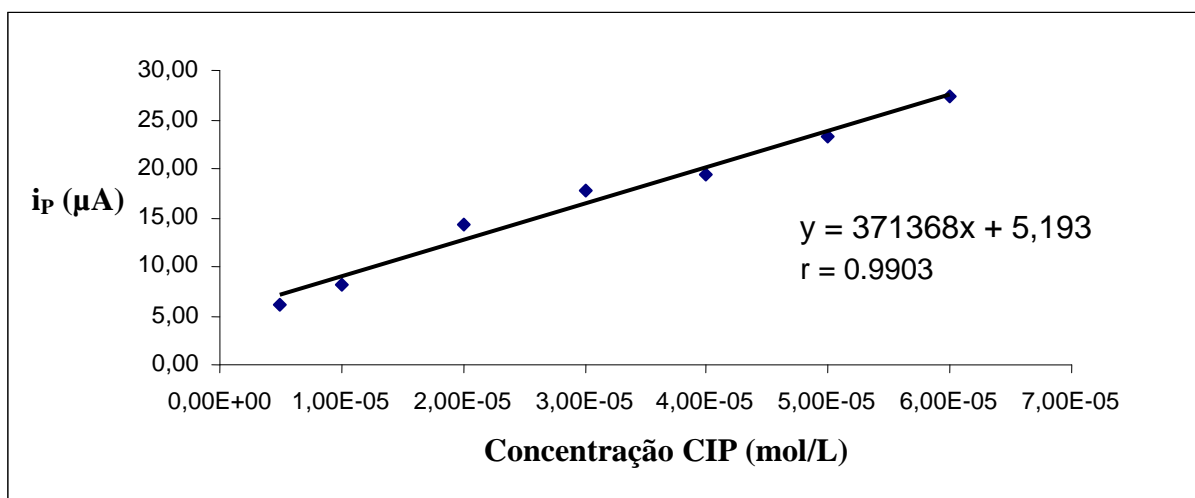


Figura 20: Estudo da linearidade entre a  $i_p$  e a concentração da CIP (GCE).

A curva de calibração linear é indicada na Figura 21.



**Figura 21: Representação da curva de calibração (GCE).**

As características desta curva de calibração bem como os limites de detecção e quantificação calculados a partir desta, são indicados na Tabela 6.

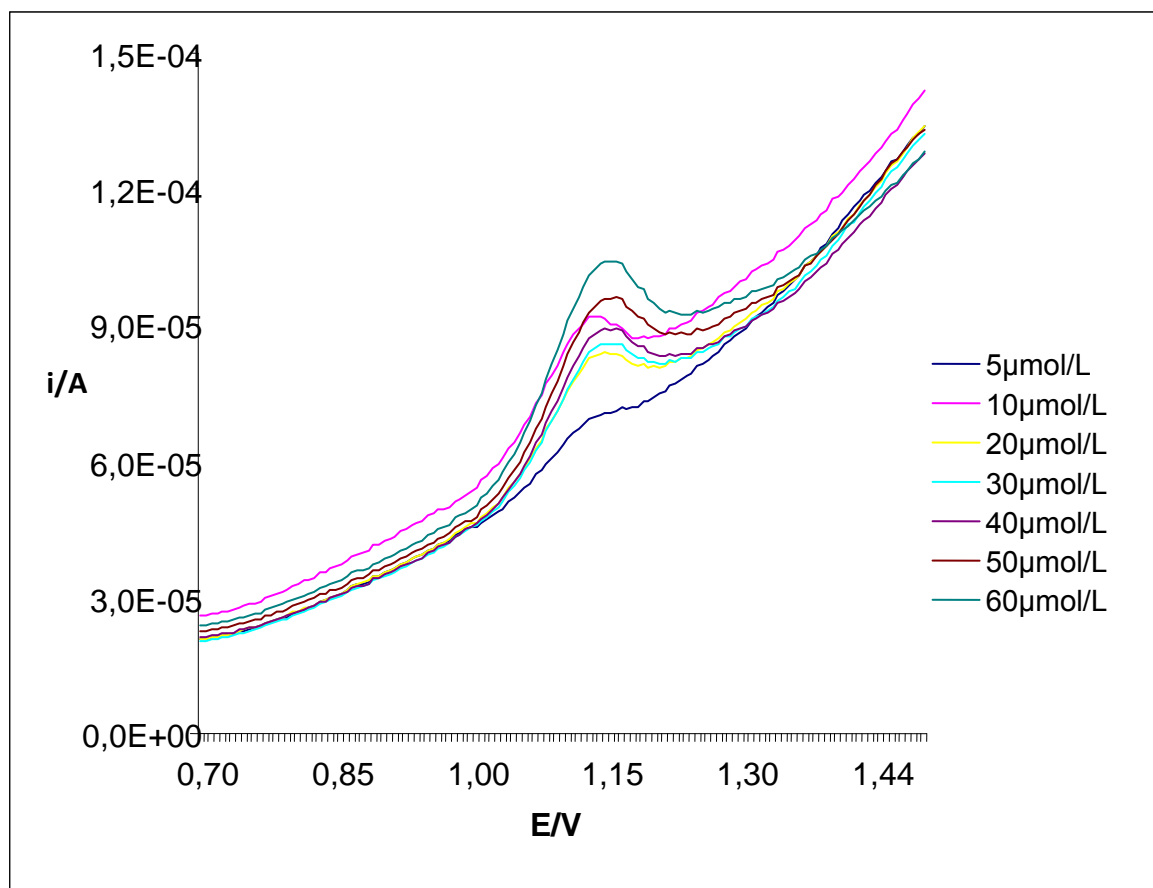
O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9903, pelo que se pode afirmar que a resposta da CIP é linear entre  $5,0 \times 10^{-6}$  mol/L e  $6,0 \times 10^{-5}$  mol/L. A explicação para o coeficiente não ser mais próximo de um, deve-se ao facto da necessidade de limpeza manual do eléctrodo de trabalho de ensaio para ensaio. A limpeza nunca é igual ao longo dos ensaios de modo que pode influenciar os resultados obtidos.

Na Figura 22 apresenta-se os voltogramas de onda quadrada obtidos na análise de soluções com concentrações na gama de linearidade.

Na Tabela 21 Anexo I apresenta-se os cálculos realizados para calcular o limite de detecção e limite de quantificação.

**Tabela 6: Características da curva de calibração para análise da CIP por SWV (pH=3,04; f=400Hz;  $\Delta E_S=6,00mV$ ;  $\Delta E_P=40,05mV$ ) (GCE).**

Parâmetros	Valores obtidos
Gama de Linearidade ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	5,0-60,0
$n$	7
Coefficiente correlação	0,9903
Declive ( $\mu A.L/mol$ )	371368
Erro do declive, $S_b$ ( $\mu A.L/mol$ )	23360
Ordenada na origem ( $\mu A$ )	5,193
Erro da ordenada na origem, $S_a$ ( $\mu A$ )	0,998
$S_{Y/X}$	$1,17 \times 10^{-6}$
LOD ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	9,48
LOQ ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	31,6



**Figura 22: Voltamogramas obtidos na análise de CIP por SWV em tampão Britton-Robinson (pH=3,04) na zona linear (GCE) (f=400Hz;  $\Delta E_S=6,00mV$ ;  $\Delta E_P=40,05mV$ ).**

Depois de determinada a zona de linearidade, pretende-se estudar a repetibilidade e precisão intermédia na zona linear. Repetibilidade consiste em realizar cinco ensaios seguidos para cada concentração escolhida. Escolhe-se três concentrações da zona linear. Precisão intermédia é efectuar ensaios em três dias diferentes mantendo as mesmas condições dos ensaios.

As concentrações escolhidas da zona linear foram:  $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-5}$  e  $5,0 \times 10^{-5}$  mol/L. A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo, sendo os valores obtidos apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7: Avaliação da precisão para a análise da CIP por SWV (GCE).**

<b>Concentração (mol/L)</b>	<b>Repetibilidade (RSD%) (n=5)</b>	<b>Precisão intermédia (RSD%) (n=3)</b>
$1,00 \times 10^{-5}$	4,17	9,92
$3,00 \times 10^{-5}$	5,46	6,47
$5,00 \times 10^{-5}$	5,01	6,15

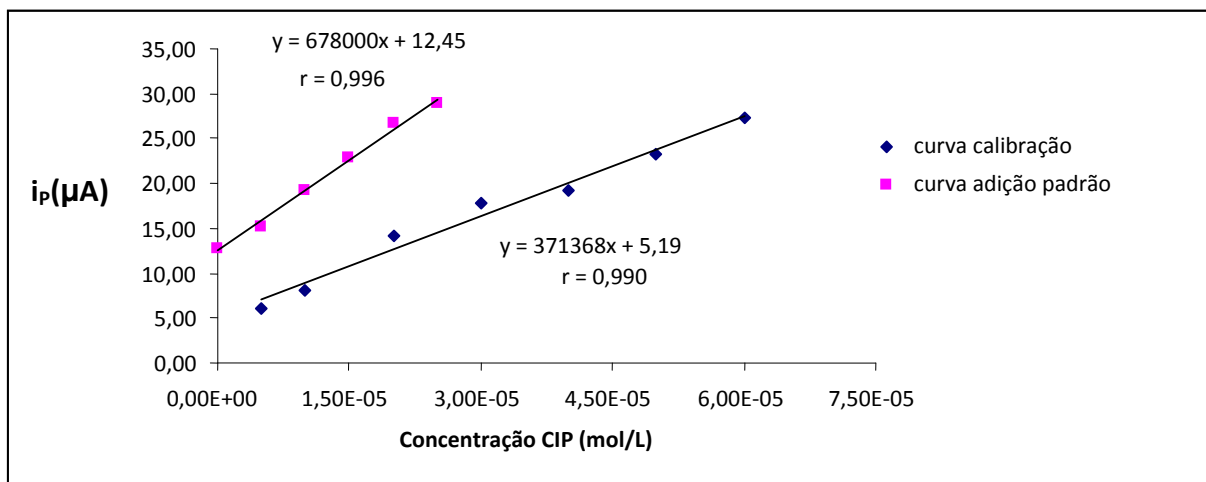
Analisando a tabela, verifica-se que os desvios padrões obtidos são superiores aos valores para os quais se pode afirmar que os resultados são precisos. Os resultados são considerados satisfatórios quando o desvio padrão é inferior a 5%. No caso da célula clássica os valores superiores são derivados à limpeza do eléctrodo, facto que torna mais difícil a obtenção de valores precisos.

De notar que a repetibilidade é melhor que a precisão intermédia e que a precisão dos resultados melhora à medida que a concentração de CIP aumenta.

Com os estudos da selectividade pretendeu-se determinar se o método é selectivo, ou seja, se os excipientes presentes nos comprimidos do fármaco interferiam com os resultados.

Para os ensaios realizados no estudo da selectividade preparou-se uma solução do fármaco de concentração  $1,50 \times 10^{-5}$  mol/L, à qual se adicionou quantidades crescentes da solução stock de CIP de concentração  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L. As quantidades foram adicionadas de modo a obter-se concentrações de  $5,00 \times 10^{-6}$ ;  $1,00 \times 10^{-5}$  e  $1,50 \times 10^{-5}$ ,  $2,00 \times 10^{-4}$  e  $2,50 \times 10^{-4}$  mol/L. O declive da curva de adição padrão foi comparado com o declive da curva de calibração (sem adição do fármaco).

A curva de calibração e a curva de adição padrão obtidas pela célula clássica são representadas na Figura 23, sendo os valores obtidos para a construção dessas curvas apresentados na Tabela 23 do Anexo I.



**Figura 23: Representação da curva de calibração e da curva de adição padrão (GCE).**

A razão entre os declives das duas curvas (1,8) confirma que os excipientes presentes no fármaco analisado interferem com os resultados. Pode-se afirmar que o método não é selectivo na análise da CIP neste fármaco. Isto não permite o uso do método da curva de calibração para a quantificação de CIP no fármaco em estudo, devendo-se utilizar o método da adição padrão.

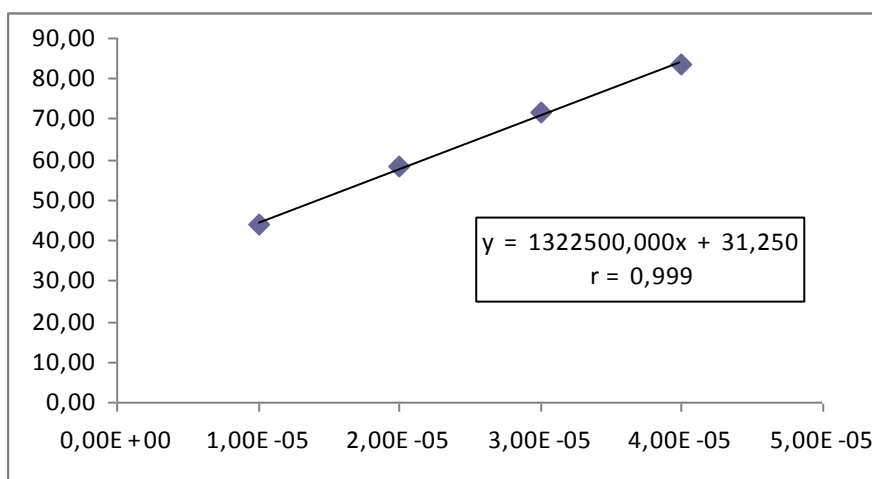
### 3.2.2. Eléctrodo de carbono impresso (SPCE)

Depois de se estudar o comportamento da CIP com a célula voltamétrica clássica, pretendeu-se depois usar uma célula voltamétrica mais moderna, a SPCE, para se comparar os resultados obtidos com células diferentes de modo avaliar qual a mais adequada.

Dever-se-ia começar com a optimização dos parâmetros da SWV, mas tal não foi efectuado com vista a poupar o número de células de SPCE a usar. Utilizou-se os valores dos parâmetros optimizados anteriormente na célula clássica. Caso não se conseguir-se obter resultados da CIP então fazia-se novamente a optimização dos parâmetros.

Começou-se por realizar o estudo da linearidade entre a concentração da CIP e a  $i_p$ . De modo a encontrar-se esta relação linear foi analisado soluções com concentrações entre  $1,00 \times 10^{-7}$  e  $7,00 \times 10^{-5}$  mol/L.

A resposta da ciprofloxacina tem uma tendência crescente com o aumento da concentração até  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L tendendo depois a estabilizar. A curva de calibração linear é indicada na Figura 24.



**Figura 24: Representação da curva de calibração (SPCE).**

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,999, pelo que de facto se pode afirmar que a resposta da ciprofloxacina é linear entre  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L e  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L.

As características da curva de calibração bem como os limites de detecção e quantificação calculados a partir desta, são indicados na Tabela 8.

Na Figura 25 apresenta-se os voltagramas de onda quadrada obtidos na análise de soluções com concentrações na gama de linearidade.

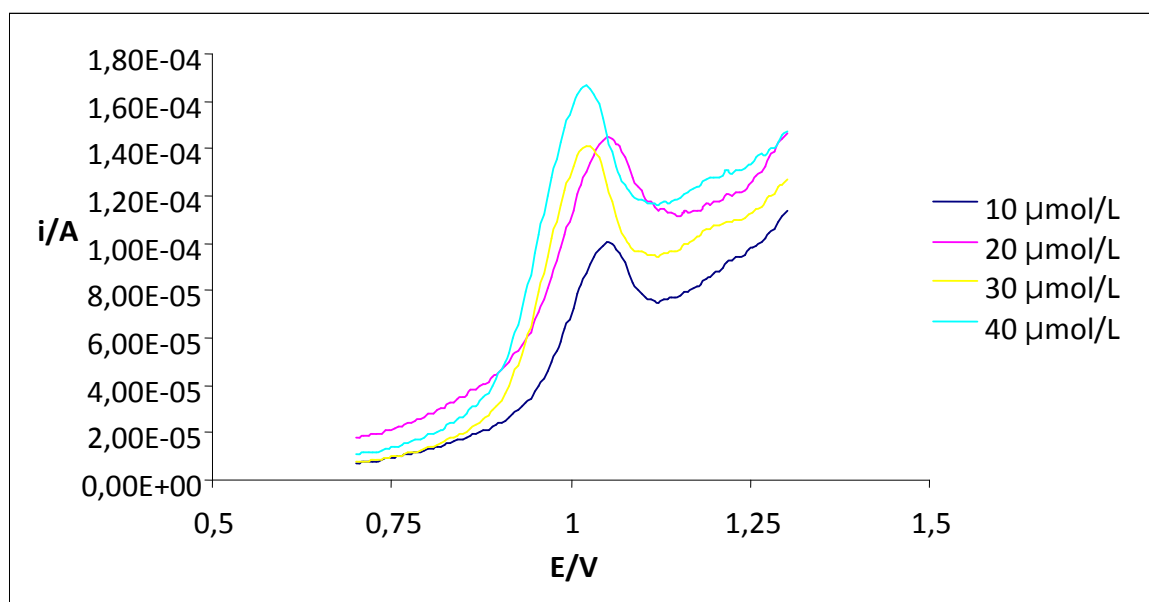
Na Tabela 24 Anexo I apresenta-se os cálculos realizados para calcular o limite de detecção e limite de quantificação

**Tabela 8: Características da curva de calibração para análise da CIP por SWV (pH=3,04; f=400Hz;  $\Delta E_S=6,00\text{mV}$ ;  $\Delta E_P=40,05\text{mV}$ ) (SPCE).**

Parâmetros	Valores obtidos
Gama de Linearidade ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	10,0-40,0
<i>n</i>	4
Coefficiente correlação	0,9990
Declive ( $\mu\text{A.L/mol}$ )	1322500
Erro do declive, $S_b$ ( $\mu\text{A.L/mol}$ )	41940
Ordenada na origem ( $\mu\text{A}$ )	31,250
Erro da ordenada na origem, $S_a$ ( $\mu\text{A}$ )	1,03
$S_{Y/X}$	$9,38 \times 10^{-7}$
LOD ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	2,13
LOQ ( $\times 10^{-6}$ mol/L)	7,09

Comparando os resultados obtidos pelas duas células observa-se que a sensibilidade é superior na célula SPCE, provavelmente devido à maior área do eléctrodo.

Relativamente aos valores obtidos de LOD e LOQ para os dois tipos de células, constata-se que estes são menores para a célula SPCE. A célula SPCE permite assim detectar concentrações mais baixas de CIP. No entanto não permite quantificar com exactidão concentrações tão altas como as que se consegue com a célula clássica.



**Figura 25: Voltamogramas obtidos na análise de CIP por SWV em tampão Britton-Robinson (pH=3,04) na zona linear (SPCE) ( $f=400\text{Hz}$ ;  $\Delta E_S=6,00\text{mV}$ ;  $\Delta E_P=40,05\text{mV}$ ).**

Posteriormente para o estudo da repetibilidade e precisão intermédia, as concentrações escolhidas da zona linear foram:  $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-5}$  e  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L. A satisfação dos resultados foi avaliada através do desvio padrão relativo, sendo este parâmetro apresentado na Tabela 9.

**Tabela 9: Avaliação da precisão para a análise da CIP por SWV (SPCE).**

Concentração (mol/L)	Repetibilidade (RSD%) (n=5)	Precisão intermédia (RSD%) (n=3)
$1,00 \times 10^{-5}$	1,11	0,85
$3,00 \times 10^{-5}$	1,61	0,10
$4,00 \times 10^{-5}$	0,59	0,21

Analisando a tabela, verifica-se que os desvios padrões obtidos são inferiores a 5%, pelo que se pode afirmar que os resultados obtidos utilizando o SPCE são precisos. De notar que a precisão intermédia é melhor que a repetibilidade.

Em relação à precisão, esta é melhor para a SPCE em comparação com a célula clássica devido à eliminação da limpeza do eléctrodo de trabalho. Com base nisto conclui-se que a célula de SPCE é a célula mais adequada para a análise da CIP.

Uma ideia que surgiu com o decorrer do trabalho experimental foi a rentabilização das células de SPCE. Caso se pode-se usar a mesma célula para mais do que um ensaio, estar-se-ia a poupar nos custos associados às células.

Na Tabela 10 apresenta-se os valores obtidos da  $i_p$  da CIP usando a mesma célula em ensaios sucessivos.

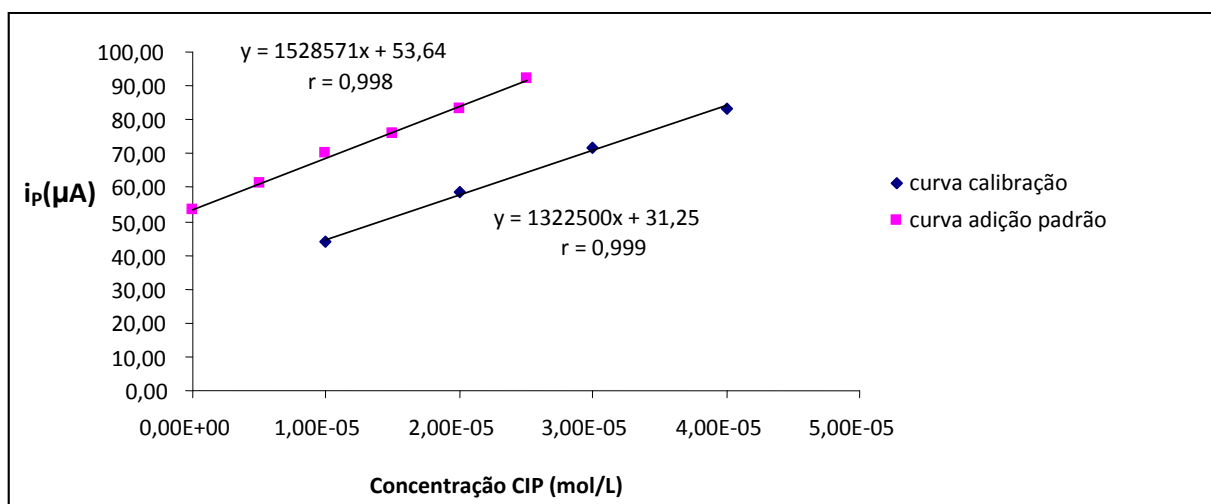
**Tabela 10: Resposta da CIP usando a mesma célula (SPCE) em ensaios sucessivos para uma dada concentração.**

Concentração (mol/L)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )
$1,00 \times 10^{-5}$	47,60
	34,80
	30,60
$3,00 \times 10^{-5}$	79,90
	68,10

Pela análise da Tabela 10 constata-se que a resposta da CIP vai diminuindo sucessivamente, para uma dada concentração, ao usar sempre a mesma célula de análise. Conclui-se então que não se pode reutilizar as células de SPCE

Nos ensaios de selectividade com célula SPCE manteve-se as concentrações utilizadas na célula clássica:  $5,00 \times 10^{-6}$ ;  $1,00 \times 10^{-5}$  e  $1,50 \times 10^{-5}$ ,  $2,00 \times 10^{-4}$  e  $2,50 \times 10^{-4}$  mol/L.

A curva de calibração e a curva de adição padrão obtidas pela célula SPCE são representadas na Figura 26, sendo os valores obtidos para a construção dessas curvas apresentados na Tabela 26 e 27 do Anexo I.



**Figura 26: Representação da curva de calibração e da curva de adição padrão (SPCE).**

A razão entre as duas curvas (1,1) confirma que os excipientes presentes no fármaco analisado não interferem significativamente com os resultados. Pode-se afirmar que o método é selectivo na análise da CIP neste fármaco. Isto permite o uso do método da curva de calibração para a quantificação da CIP no fármaco em estudo.

No doseamento da CIP na formulação farmacêutica (Ciprofloxacina 500 mg – Ranbaxy) preparou-se soluções da formulação farmacêutica de modo que as suas concentrações ( $1,5 \times 10^{-5}$ ;  $2,5 \times 10^{-5}$  e  $3,5 \times 10^{-5}$  mol/L) situassem dentro dos limites da concentração da curva de calibração ( $1,00 \times 10^{-5}$  –  $4,00 \times 10^{-5}$  mol/L). Estas soluções foram analisadas e com as intensidades de corrente do pico (Tabela 28 – Anexo I) foram calculadas as concentrações de CIP através da interpolação na curva de calibração. O valor rotulado (500 mg/comprimido) está de acordo com o resultado obtido ( $514 \pm 20$  mg/comprimido ( $n = 3$ )).

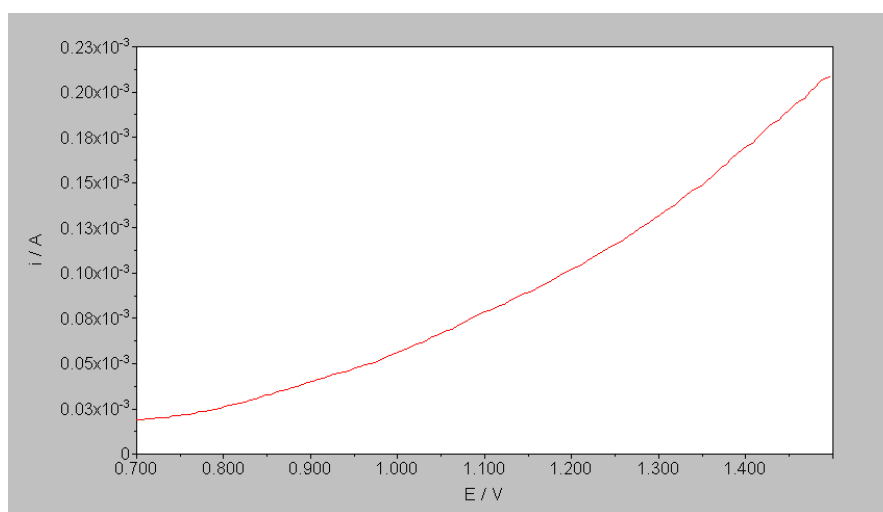
### 3.3. Remediação

#### 3.3.1. Interferência do permanganato potássio, peróxido de hidrogénio e manganês

Começou-se por verificar se os sinais voltamétricos dos oxidantes podiam interferir na  $i_p$  da CIP. Foram testados os oxidantes peróxido de hidrogénio e permanganato de potássio e o produto da reacção entre a CIP e o permanganato, o manganês, pretendendo-se analisar a obtenção de resposta dos compostos isoladamente. O desejado era não obter sinal voltamétrico com o oxidante, para posteriormente não interferir no sinal voltamétrico da CIP. O teste foi realizado com concentrações de cada composto de:  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L,  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L e  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L.

Não é obtido nenhum sinal voltamétrico para as diversas concentrações testadas do peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio e manganês. Isto pode significar que nenhum composto interfere na resposta voltamétrica da CIP ou os oxidantes têm uma zona de resposta diferentes da mesma gama de potencias da CIP.

Na figura seguinte apresenta-se um exemplo de voltagrama obtido para o permanganato de concentração  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L.



**Figura 27: Voltagrama do permanganato para a concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L (GCE).**

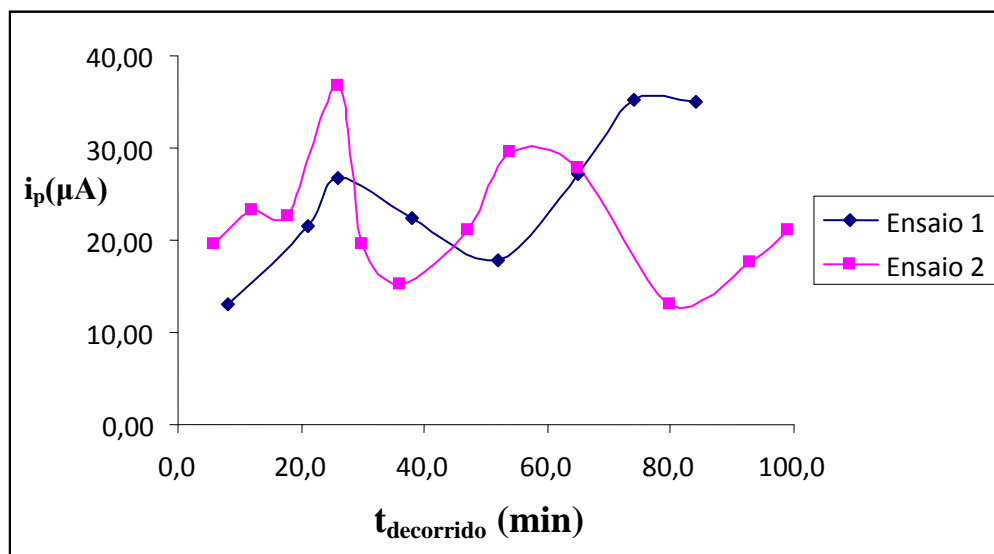
### 3.3.2. Permanganato de potássio e peróxido de hidrogénio

Nesta fase do estudo pretendia-se seleccionar um oxidante que fosse capaz de degradar o antibiótico em estudo quando presente em solos. Os oxidantes a testar foram o permanganato de potássio e o peróxido de hidrogénio. Depois de analisados os resultados obtidos, determinou-se o que poderia ser aplicado no solo.

Os ensaios foram realizados com a célula clássica. A reacção entre o oxidante e a CIP ocorre em meio ácido a pH 1, pois é neste pH que os oxidantes actuam melhor. No entanto as leituras foram efectuadas a pH óptimo de 3,04, o que obrigou a um ajuste de pH em cada leitura efectuada.

É esperado uma diminuição do sinal da CIP com o decorrer da reacção, sinal da degradação do antibiótico devido á acção do oxidante, até a CIP ser totalmente degradada.

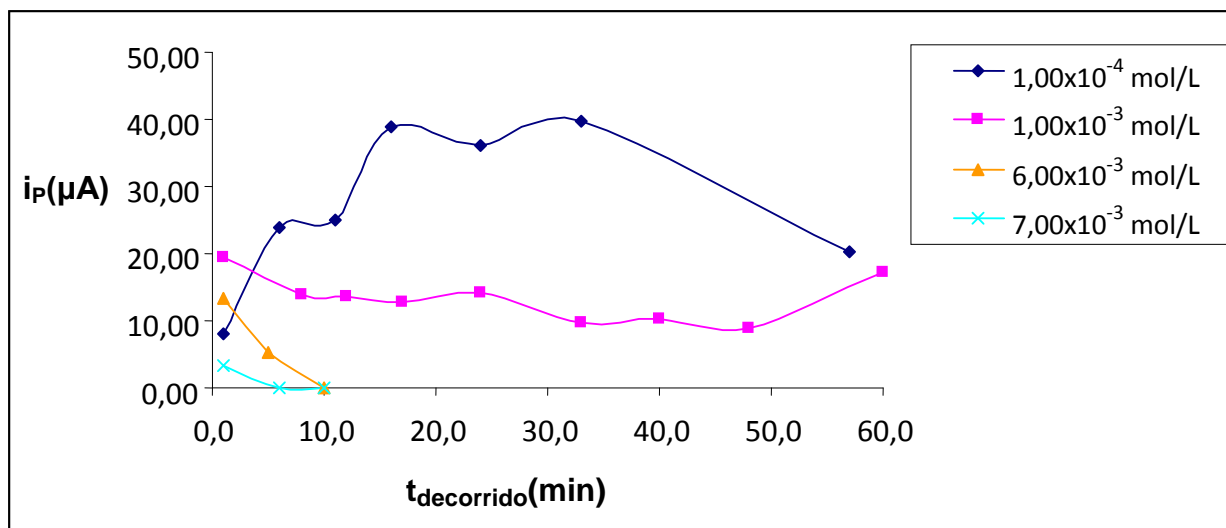
Os resultados obtidos com o peróxido de hidrogénio são representados na Figura 28. As concentrações de oxidante e CIP utilizadas foram  $7,00 \times 10^{-3}$  mol/L e  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L, respectivamente.



**Figura 28: Resultados de peróxido de hidrogénio com célula clássica.**

Os resultados revelam que o peróxido de hidrogénio não é eficaz na degradação da CIP. Ao longo da reacção, nos dois ensaios realizados, o sinal voltamétrico da CIP varia não chegando a zero.

Quanto ao permanganato de potássio foram testadas várias concentrações do oxidante, para depois se determinar qual a concentração que poderá ser mais eficaz na degradação da CIP. As concentrações de permanganato foram:  $1,00 \times 10^{-4}$ ,  $1,00 \times 10^{-3}$ ,  $6,00 \times 10^{-3}$ ,  $7,00 \times 10^{-3}$  mol/L. A concentração testada de CIP foi de  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 29.



**Figura 29: Resultados de permanganato de potássio com célula clássica.**

Os resultados obtidos mostram que a acção de decomposição do permanganato depende da sua concentração. Para as concentrações de oxidante  $1,00 \times 10^{-4}$  mol/L e  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L, este não é eficaz na degradação da CIP. A concentração de permanganato não é suficiente para conseguir decompor a CIP em compostos com menores efeito prejudiciais que a CIP. Para as concentrações  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L e  $7,00 \times 10^{-3}$  mol/L a reacção entre o oxidante e a CIP ocorre rapidamente levando ao desaparecimento do antibiótico em solução. Prova-se que o permanganato é um oxidante possível de usar posteriormente em ensaios com solo contaminado com este antibiótico.

### 3.3.3. Ensaios com solo húmico/areia

Após constatação que o permanganato é um oxidante adequado para a degradação da CIP, pretendeu-se na remediação, avaliar se essa mesma constatação se verifica num solo contaminado com esse mesmo antibiótico. Os ensaios foram realizados com célula clássica, porque é necessário em cada leitura adicionar a amostra solução

tampão para a análise ser realizada a pH 3,04. Nas células SPCE não é possível essa mistura, facto que levou a usar as células clássicas nos ensaios.

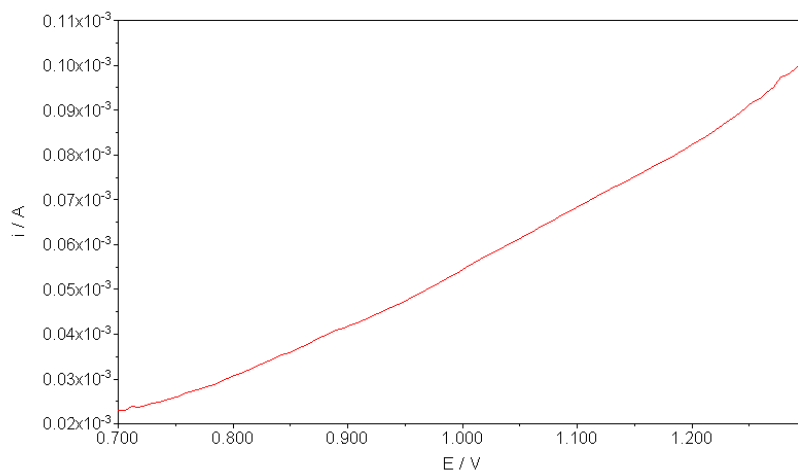
Num primeiro ensaio a concentração de CIP foi de  $1,00 \times 10^{-6}$ . A concentração de permanganato de potássio e o volume adicionado ao solo é constante em todos os ensaios realizados. Na Tabela 11 apresenta-se as condições experimentais do primeiro ensaio.

**Tabela 11: Condições experimentais do primeiro ensaio com célula clássica.**

	Concentração (mol/L)	Volume adicionado ao solo (mL)
CIP	$1,00 \times 10^{-6}$	0,200
Permanganato	$6,00 \times 10^{-3}$	20,00

Juntamente com os 0,200mL de CIP adicionada ao solo, é também adicionado 1,8mL de água desionizada.

O resultado da resposta da CIP é representado na Figura 30.

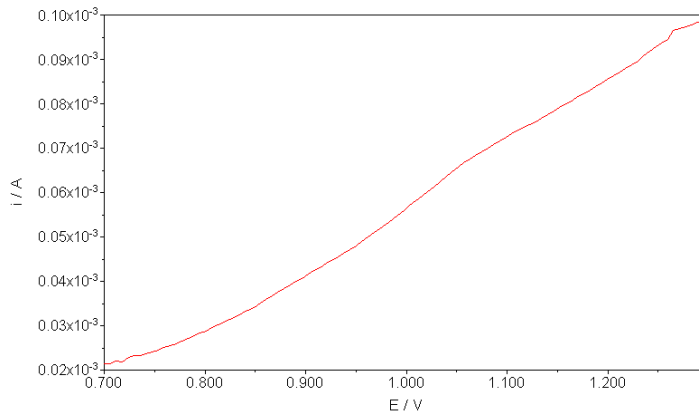


**Figura 30: Voltograma da CIP no primeiro ensaio realizado (tempo decorrido=5min).**

Constata-se que não existe resposta da CIP. Este facto poderá ter três explicações: a CIP poderá ficar adsorvida no solo e não passar para a fase líquida não sendo depois detectada aquando da análise por SWV; a reacção entre a CIP e o permanganato é muito rápida já não sendo detectada após 5min de reacção; utilizou-se uma concentração de CIP demasiado baixa. Neste caso a quantidade adicionada de CIP

poderá ser baixa, o que leva a uma rápida degradação. Posteriormente realiza-se uma série de ensaios com o objectivo de se perceber qual das explicações se aplica.

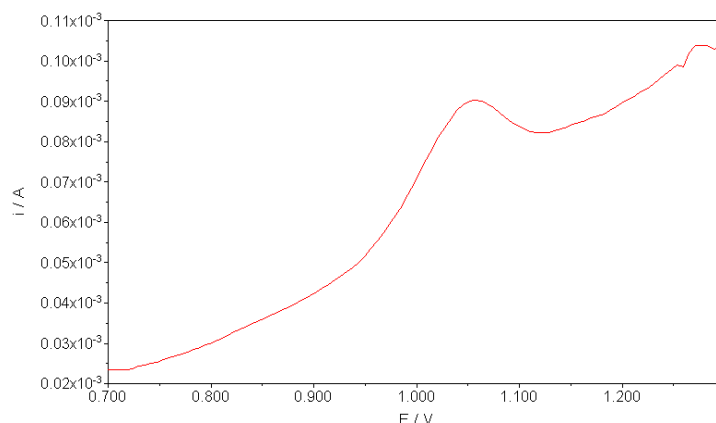
De seguida realizou-se um novo ensaio, desta vez aumentando a concentração de CIP para  $1,5 \times 10^{-5}$  mol/L, correspondendo a 3,00mL de CIP adicionada ao solo. Em vez de se adicionar 20,00mL de oxidante adicionou-se 20,00mL de água desionizada. Na Figura 31 representa-se o voltamograma do ensaio.



**Figura 31: Voltamograma obtido no ensaio realizado no solo .**

O resultado obtido mostra que não se continua obter resposta da CIP. A explicação não é a quantidade insuficiente de CIP adicionada ao solo, mas poderá ser o facto de o antibiótico ser adsorvido pelo solo, não sendo depois detectado na fase líquida.

Para se tirar as dúvidas realizou-se o mesmo ensaio, mas substituindo o solo húmico por areia. A razão da utilização de areia deveu-se ao facto de a areia não conter matéria orgânica capaz de adsorver a CIP. O resultado obtido apresenta-se na Figura 32.



**Figura 32: Resultado do ensaio realizado com aplicação em areia.**

A obtenção de resposta da CIP no ensaio prova que a areia não adsorve a CIP. Fazendo uma analogia com o ensaio realizado no solo húmico, pode significar que o solo poderá adsorver a CIP, não permitindo que esta passe para a fase líquida. Isto faz com que não se detecte sinal voltamétrico da CIP aquando da análise por SWV. Outro significado para a não obtenção de resposta da CIP no ensaio no solo poderá ser a adsorção desta por parte do solo no início da reacção, sendo que após a adição do permanganato, a CIP poderá ser destruída por acção do oxidante. No entanto não temos como comprovar estes factos.

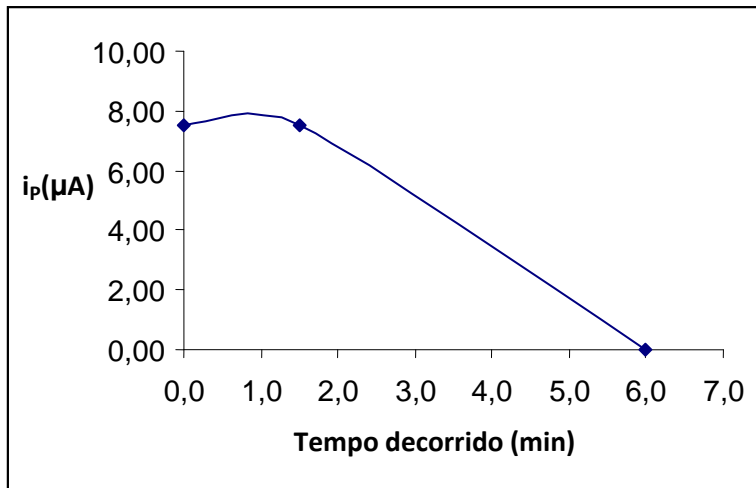
A seguir realizou-se um ensaio em areia adicionando agora o oxidante ao meio numa concentração de  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L. O resultado obtido é apresentado na Tabela 12.

**Tabela 12: Ensaio realizado em areia adicionando-se permanganato.**

Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )	Concentração CIP (mol/L)
0	7,49	$1,50 \times 10^{-4}$
1,5	7,53	$6,29 \times 10^{-6}$
6,0	0	0

O valor referente à  $i_p$  para  $t=0$  é apenas uma estimativa. É calculado através da equação da recta, representando apenas as duas restantes medições efectuadas.

De seguida é feita uma representação gráfica, Figura 33, para melhor visualização da tendência da concentração ao longo do tempo de reacção.



**Figura 33: Representação da evolução da  $i_p$  em função do tempo de reacção decorrido.**

Analisando a figura exposta, constata-se uma rápida diminuição da  $i_p$  da CIP ao longo do tempo, significando que a CIP é degradada rapidamente por acção do permanganato. Conclui-se que o permanganato é um oxidante adequado para a degradação da CIP em meios contaminados com este antibiótico, desde que esse meio não absorva a CIP.



## 4. Conclusão

O produto farmacêutico seleccionado foi um antibiótico, a ciprofloxacina, sendo um dos antibióticos mais vendidos em 2007 em termos de número de embalagens.

O estudo da ciprofloxacina foi realizado pela técnica de voltametria de onda quadrada. Foram testados dois tipos de células de voltametria: uma célula clássica e uma SPCE. Para o sistema funcionar é necessário introduzir uma série de parâmetros, parâmetros esses que foram primeiramente otimizados para depois servir de base para os ensaios a realizar. Os valores dos parâmetros otimizados foram: pH (3,04), frequência (400Hz), incremento de potencial (6,00 mV) e amplitude do impulso de potencial (40,05 mV).

Os resultados da linearidade obtidos mostram uma gama mais estreita e de valores mais elevados para a célula SPCE, provando uma maior eficácia deste tipo de célula comparativamente com a célula clássica. Um factor que explica a diferença de valores entre as duas células é a limpeza do eléctrodo de trabalho. No caso da célula clássica foi necessário efectuar a limpeza manual do eléctrodo de trabalho depois de cada leitura. Sendo a limpeza manual, não se consegue efectuá-la da mesma maneira para todas as leituras, facto esse que provocou um certo erro nos resultados obtidos.

Analisando os resultados obtidos da repetibilidade e precisão intermédia, constata-se que pela célula clássica há uma maior dificuldade em obter resultados concordantes para uma mesma concentração de ciprofloxacina. Existe alguns ensaios que são desprezados, pois para se obter cinco ensaios concordantes foi necessário realizar, na maioria dos casos, seis a sete ensaios. Este facto prova que a repetibilidade deste tipo de célula não é muito boa. Outro argumento que prova que a repetibilidade não é boa é o facto de o desvio padrão relativo dar superior a 5%. Relativamente á precisão intermédia, esta também não é aceitável uma vez que o desvio padrão relativo também deu superior a 5%. Quanto à célula SPCE, obteve-se uma boa repetibilidade e precisão intermédia pois os desvios padrões relativos obtidos foram baixos, estando abaixo dos 5%. Conclui-se assim que os resultados obtidos com a célula SPCE foram precisos, sendo esta célula a mais adequada na análise da ciprofloxacina.

No decorrer do estudo, para a célula de SPCE, tentou-se saber se era possível usar uma mesma célula de análise em sucessivas leituras para assim se poder reduzir os custos associados á aquisição do equipamento. Chegou-se à conclusão que cada leitura tem de ser feita com células diferentes. Ao serem usadas apenas uma vez as células de análise eliminam o erro associado à sua limpeza de eléctrodo de trabalho, levando depois

a resultados mais fiáveis na obtenção da resposta da ciprofloxacina, pois todas as leituras são realizadas nas mesmas condições.

Os resultados obtidos no estudo quanto à voltametria de onda quadrada são satisfatórios. A ilação que se pode tirar é que a técnica de voltametria de onda quadrada é possível de aplicar na pesquisa da ciprofloxacina. É uma técnica de fácil aplicação e com tempos de resposta rápidos. Em termos de tipo de célula, provou-se que com a célula SPCE se obtém melhores resultados. Observou-se que os valores obtidos da resposta da CIP são mais precisos na célula SPCE, pois existe um menor número de factores capazes de influenciar os resultados nesta célula. Provou-se assim que a célula SPCE é uma célula mais eficaz e fiável do que a célula clássica. As células SPCE são as células voltamétricas mais indicadas para situações em que a ciprofloxacina esteja presente em pequenas quantidades, pois com este tipo de célula consegue-se detectar CIP em concentrações mais baixas do que com a célula clássica. Isto é provado com a obtenção de menor valor de LOD nas células SPCE.

Depois de realizado o estudo, pode-se agora fazer uma breve comparação com os estudos realizados ao longo dos anos com a CIP. Analisando-se a gama de concentrações obtidas com as células SPCE (célula mais eficaz) entre o LOD ( $2,13 \times 10^{-6}$  mol/L) e o LOQ ( $7,09 \times 10^{-6}$  mol/L), verifica-se que é uma gama mais alargada do que o estudo realizado por Reverte S., Borrull F., Pocurull E. e Marce R. M. Analisando os estudos já realizados, verifica-se que são obtidos limites de detecção e de quantificação menores do que o obtido neste estudo com voltametria. Constata-se que a voltametria de onda quadrada permite quantificar com precisão maiores concentrações de CIP do que com os restantes métodos analíticos já estudados.

No entanto, em termos de custos associados, a célula SPCE tem um custo maior. Isto porque, como uma célula de análise SPCE só se utiliza para uma leitura apenas, para realizar o estudo em causa são necessárias bastantes células de análise. Neste estudo foram necessárias cerca de 250 células SPCE. Para se ter uma ideia, cada célula SPCE custa à volta de 1,50€. Por seu lado, uma célula clássica pode ascender aos 375€ mas tem um tempo de vida longo. Pode ter um tempo de vida de um ano, permitindo a sua utilização em vários estudos a realizar. A escolha da célula de análise depende do grau de rigor pretendido nos ensaios a realizar (ex.: ensaios só para se verificar como funciona a técnica em estudo, ensaios com a finalidade de publicação, etc.) e do fim a que se destina os ensaios (ex.: teste laboratorial, estudo científico, amostragem industrial, etc.).

Recorrendo às células SPCE foi possível realizar o doseamento da formulação farmacêutica pelo método da curva de calibração, para a quantificação de ciprofloxacina no fármaco em estudo, pois a razão entre o declive da curva de calibração e a curva de adição padrão foi praticamente igual a 1, confirmando os excipientes presentes no fármaco analisado não interferem com os resultados. O valor rotulado (500 mg/comprimido) está de acordo com o resultado obtido ( $514 \pm 20$  mg/comprimido). Já com a célula clássica não foi possível a utilização do método da curva de calibração para a quantificação de ciprofloxacina pois a razão entre os declives das duas curvas (1,8) é consideravelmente superior a 1. Deve-se utilizar o método da adição padrão.

Na determinação do oxidante mais eficaz na degradação da ciprofloxacina, os resultados obtidos mostram diferenças entre os dois oxidantes testados: o peróxido de hidrogénio e o permanganato de potássio. Pretende-se determinar qual o mais adequado, para depois realizar ensaios no solo com o objectivo de testar a sua capacidade de tratamento. Para o peróxido de hidrogénio os resultados obtidos foram inconclusivos, prevendo-se que este oxidante não seja eficaz na degradação da ciprofloxacina. No caso do permanganato de potássio, os resultados mostram que a degradação da ciprofloxacina depende da concentração do oxidante. Conclui-se que a partir de  $6,00 \times 10^{-3}$  mol/L em permanganato a ciprofloxacina foi rapidamente degradada, isto para uma concentração de ciprofloxacina de  $3,00 \times 10^{-4}$  mol/L.

Relativamente à aplicação do permanganato de potássio, realizou-se uma série de ensaios alterando as variáveis concentração de ciprofloxacina ( $1,00 \times 10^{-6}$  e  $1,50 \times 10^{-5}$  mol/L) e meio contaminado com ciprofloxacina (solo húmico e areia). Dos resultados obtidos foi possível concluir que a ciprofloxacina é adsorvida pelo solo não passando para a fase líquida, não sendo depois detectada aquando da análise por voltametria de onda quadrada. A solução é usar um solvente orgânico capaz de extrair o antibiótico do solo. No entanto este solvente pode interferir com o sinal voltamétrico da ciprofloxacina. Tem que se seleccionar qual o solvente mais adequado para este estudo e realizar nova optimização de parâmetros. Contudo isto não foi efectuado devido ao cumprimento do prazo de entrega deste estudo. No entanto poderá ser um bom início para um estudo futuro.

## 5. Estudos Futuros

- Um estudo que se pode realizar no futuro é estudar um solvente orgânico capaz de extrair a ciprofloxacina do solo, para depois ser possível a degradação do antibiótico com um oxidante. Uma solução é utilizar uma extracção sólido-líquido;
- Outro estudo que se pode realizar é a aplicação de outra técnica na monitorização da ciprofloxacina. Por exemplo, pode ser usada a cromatografia líquida pois é uma técnica bastante utilizada na análise da ciprofloxacina, como se prova pelos artigos apresentados na secção 1.3;
- Utilização de um método electroquímico de remediação;

## 6. Bibliografia

[1] – [Http://br.geocities.com](http://br.geocities.com) (acedido em 15-02-2009)

[2] – [www.netdrugs.info](http://www.netdrugs.info) (acedido em 20-01-2009)

[3] – Alvarez M. D., Turiel E., Esteban A. M., 2009, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 899–905

[4] – Sowinski K. M., Kays M. B., 2004, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 29, 381–387

[5] – Kim D. H., Lee S. K., Park Y. H., Lee D. W., 2000, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23(7), 1069–1081

[6] – Jianzhong S., Haiyan L., Haiyang J., Degang Z., Fei X., Jiancheng L., Shuangyang D., 2008, *Journal of AOAC International* 91, 1499-1506

[7] – Reverte S., Borrull F., Pocurull E., Marce R. M., 2003, *Journal of Chromatography A*, 1010, 225–232

[8] – Gómez A. Z., Garballo A., Ballesteros O., Navalón A., Ayuso L. E., 2008, *Biomedical Chromatography* 22, 1186–1193

[9] – Carballo E. M., Barreiro C. G., Scharf S., Gans O., 2007, *Environmental Pollution* 148, 570–579

[10] – Mitani K., Kataoka H., 2006, *Analytica Chimica Acta* 562, 16–22

[11] – Kim D. H., Lee S. K., Park Y. H., Lee D. W., 2002, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25(3), 433–443

[12] – Krzek J., Hubicka U., Szczepanczyk J., 2005, *Journal of AOAC International* 88, 1530–1536

- [13] – Idowu O. R., Peggins J. O., 2004, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, 143–153
- [14] – Imre S., Dogaru M. T., Vari C.E., Muntean T., Kelemen L., 2003, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33, 125–130
- [15] – Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H., 2003, *Journal of Chromatography B* 789, 373–381
- [16] – Seifrtová M., Pena C. M., Solich P., 2008, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 799–805
- [17] – Yang G. X., Lin B. Y., Zeng Z. L., Chen Z. L., Huang X. H., 2005, *Journal of AOAC International* 88, 1688–1694
- [18] – Schneider M. J., Vazquez-Moreno L., Bermudez-Almada M. D., Guardado R. B., Ortega-Nieblas M., 2005, *Journal of AOAC International* 88, 1160–1166
- [19] – Roybal J. E., Walker C. C., Pfenning A. P., Turnipseed S. B., Storey J. M., Gonzales S. A., Hurlbut J. A., 2002, *Journal of AOAC International* 85, 1293–1301
- [20] – Liu Y. M., Jia Y. X., Tian W., 2008, *Journal of Separation Science* 31, 3765–3771
- [21] – Lara F. J., Campaa A. M. G., Barrero F. A., Sendra J. M. B., Ayuso L. E. G., 2006, *Analytical Chemistry* 78 (22), 7665–7673
- [22] – Sun H. W., Li L. Q., Chen X. Y., 2006, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 1314–1319
- [23] – Zhuoyong Z., Xia L., Baohua S., Huichun Z., 2006, *Journal of Rare Earths* 24, 285–288
- [24] – Issa M. M., Nejem R. M., Al-Kholy M., El-Abadla N. S., Helles R. S., Saleh A. A., 2008, *Journal of the Serbian Chemical Society* 73, 569 – 576

- [25] – Wei S., Lin J., Li H., Lin J. M., 2007, *Journal of Chromatography A* 1163, 333–336
- [26] – Muñoz S. M., García J. L., Castro M. D., 2004, *Journal of Chromatography A* 1059, 25–31
- [27] – Abulkibash A. M., Sultan S. M., Al-Olyan A. M., Al-Ghannam S. M., 2003, *Talanta* 61, 239–244
- [28] – Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., “Fundamentos de Química Analítica”-tradução da 8ª edição norte-americana, Editora Thomson
- [29] – Bard A.J., Faulkner L. R., “Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications”, John Wiley & Sons Inc., New York, 2001
- [30] – Souza D., Machado S. A. S., Avaca L.A., 2003, *Química Nova* 26, 81–89
- [31] – Bergamini M. F., Santos D. P., Zanoni M. V. B., 2009, *Bioelectrochemistry* in press
- [32] – Miller J. N., Miller J. C., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, Prentice Hall, Harlow, 2000
- [33] – Sukul P., Lamshöft M., Zühlke S., Spittler M., 2008, *Chemosphere* 73, 1344–1350
- [34] – Lange F., Cornelissen S., Kubac D., Sein M. M., von Sonntag J., Hannich C. B., Golloch A., Heipieper H. J., Moder M., von Sonntag C., 2006, *Chemosphere* 65, 17–23
- [35] – De Witte B., Dewulf J., Demeestere K., Van Langenhove H., 2009, *Journal of Hazardous Materials* 161, 701–708
- [36] – Uslu M. O., Balcioglu I. A., 2008, *Science and Engineering* 30, 290–299
- [37] – Ermawati R., Morimura S., Tang Y., Liu K., Kida K., 2007, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103, 27–31

[38] – Fallgren P. H., Jin S., 2008, *Journal of Environmental Science and Health Part A* 43, 125–131

[39] – Adesodun J. K., Mbagwu J. S. C., 2008, *Bioresource Technology* 99, 5659–5665

[40] – Rojas Z. C., Mendoza R. B., Figueroa M. S., Sokolov M. Y., 2004, *Water, Air and Soil Pollution* 151, 397–409

[41] – Ibarrolaza A., Coppotelli B. M., Del Panno M. T., Donati E. R., Morelli I. S., 2009, *Biodegradation* 20, 95–107

[42] – Silva P. T. S., Silva V. L., Neto B. B. 2009, *Journal of Hazardous Materials* 161, 967–973

[43] – Sharma V. K., 2008, *Chemosphere* 73, 1379–1386

[44] – Song W., Chen W., Cooper W. J., Greaves J., Miller G. E., 2008, *Journal Phys. Chem. A* 112, 7411–7417

[45] – [www.dropsens.com](http://www.dropsens.com) (acedido em 25-01-2009)

## Anexos

### Anexo I – Resultados da Otimização e Validação

#### Preparação da solução mãe de ciprofloxacina

$$m_{\text{pesada}}=0,0335\text{g}$$

$$n = \frac{0.03335}{331.34} = 1.00652 * 10^{-4} \text{ mol}$$

$$C_{\text{CIP}} = \frac{1.00652 * 10^{-4}}{100.00 * 10^{-3}} = 1.00652 * 10^{-3} \text{ mol / L}$$

#### Reagentes e soluções dos tampões de pH.

Na Tabela 15 apresenta-se a composição das soluções constituintes dos tampões de pH.

**Tabela 15: Composição das soluções para a preparação das soluções tampão de Britton-Robinson.**

Constituintes	Concentração (mol/L)	Quantidade
Solução ácida (Vfinal=2L)		
CH <sub>3</sub> COOH	0,16	9,17mL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	10,788mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,16	9,893g
Hidróxido de sódio		
NaOH	0,8	8g/250mL
Nitrato de potássio		
KNO <sub>3</sub>	1,34	33,87g/250mL

### Optimização do pH

Na Tabela 16 seguinte apresenta-se os valores de  $E_p$  e  $i_p$  para cada valor de pH testado.

**Tabela 16:  $E_p$  e  $i_p$  média para cada pH.**

Tampão pH	$E_p$ (V)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$E_p$ médio (V)	$i_p$ média ( $\mu$ A)
1,78	1,168	4,17	1,166	5,15
	1,163	6,13		
2,30	1,153	5,09	1,151	6,23
	1,148	7,37		
3,04	1,333	7,29	1,231	7,41
	1,128	7,52		
4,06	1,078	4,58	1,060	6,49
	1,042	8,40		
4,29	1,078	4,55	1,053	6,71
	1,027	8,87		
4,29 Branco	1,012	1,53	1,012	0,836
	1,012	0,694		
4,96	1,113	3,09	1,060	4,49
	1,007	5,88		
5,88	1,007	2,18	0,972	2,32
	0,937	4,29		
6,75	0,942	1,40	0,912	2,32
	0,881	3,24		
6,75 Branco	0	0	0,811	0,428
	0,811	0,428		
8,17	0,891	1,21	0,854	3,41
	0,816	5,61		
8,17 Branco	0,916	0,992	0,901	0,951
	0,886	0,909		

**Optimização da frequência**

Para cada  $f$  foi determinada a  $i_p$  da CIP  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Os valores obtidos são apresentados na tabela seguinte.

**Tabela 17:  $i_p$  da CIP para cada valor de  $f$ .**

$f(\text{Hz})$	$i_p (\mu\text{A})$	$i_p$ média ( $\mu\text{A}$ )
10	3,50	3,00
	2,60	
20	3,90	4,10
	4,20	
30	5,60	5,90
	6,20	
40	10,0	8,80
	7,10	
50	9,00	7,80
	6,60	
60	7,60	7,60
	7,60	
70	6,90	7,30
	7,70	
80	9,60	9,20
	8,80	
100	9,26	9,34
	9,41	
120	11,3	10,9
	10,5	
140	10,7	10,6
	10,4	
160	12,3	12,6
	12,8	
180	12,9	12,8
	12,6	
200	13,7	13,2

Análise Voltamétrica da Ciprofloxacina – Aplicação a Medicamentos e a Remediação

	12,7	
220	14,4	15,0
	15,5	
230	14,7	14,1
	13,5	
240	16,4	16,3
	16,1	
260	14,8	15,6
	16,3	
280	16,3	16,2
	16,1	
290	17,4	17,5
	17,5	
320	21,7	20,6
	19,5	
350	25,2	24,3
	26,3	
	21,5	
400	25,3	24,5
	18,6	
	24,8	
	29,4	
450	25,6	24,7
	23,8	
500	29,9	25,4
	20,8	
550	23,0	22,1
	21,1	
600	26,2	25,9
	25,5	
650	22,3	23,6
	24,8	

**Optimização do incremento de potencial**

Para cada valor de  $\Delta E_s$  foi determinada a  $i_p$  da CIP  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L. Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte.

**Tabela 18:  $i_p$  da CIP obtidas para cada valor de  $\Delta E_s$ .**

$\Delta E_s$ (mV)	$i_p$ ( $\mu A$ )	$i_p$ média ( $\mu A$ )
1,05	7,12	7,85
	8,57	
1,95	10,7	11,0
	11,2	
3,00	15,1	14,2
	13,3	
4,05	14,8	14,3
	13,8	
4,95	26,6	25,6
	24,6	
6,00	28,3	29,0
	29,6	
7,05	27,7	28,6
	29,4	
7,95	26,8	25,7
	24,5	
9,00	23,2	24,2
	25,1	
10,05	26,4	25,8
	25,2	

**Optimização da amplitude do impulso do potencial**

Os resultados obtidos na optimização da amplitude estão representados na Tabela 19.

**Tabela 19:  $i_p$  da CIP obtidas para cada valor de  $\Delta E_p$ .**

$\Delta E_p$ (mV)	$i_p$ ( $\mu A$ )	$i_p$ média ( $\mu A$ )
4,950	5,800	5,700
	5,600	
10,05	12,00	11,35
	10,70	
15,00	13,70	15,20
	16,70	
25,05	23,70	23,60
	23,50	
30,00	20,80	21,25
	21,70	
34,95	23,90	23,60
	24,50	
40,05	24,30	26,85
	29,40	
45,00	34,90	33,45 <sup>(1)</sup>
	32,00	
49,95	27,20	28,00
	28,80	
55,05	27,80	26,50
	25,20	
60,00	25,20	27,55
	29,90	
64,95	36,20	39,10 <sup>(1)</sup>
	42,00	
75,00	27,90	30,50
	33,10	

- (1) – A  $i_p$  média do pico da CIP para os respectivos valores de  $\Delta E_p$  não seguem a tendência dos restantes valores. Pode ter ocorrido alguns erros experimentais para estes valores de  $\Delta E_p$ .

### Linearidade por GCE

Os resultados obtidos do estudo da linearidade são apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20: Resultados obtidos da linearidade da CIP por célula clássica.**

Concentração pretendida (mol/L)	Vpadrão (µL)	Vadicionar (µL)	Concentração exacta (mol/L)	$i_p$ (µA)	$i_p$ média (µA)
$5,00 \times 10^{-7}$	5		$4,998 \times 10^{-7}$	Não se obtém sinal	
$1,00 \times 10^{-6}$	10	5	$9,990 \times 10^{-7}$	5,240	6,030
				6,820	
$5,00 \times 10^{-6}$	50	40	$4,975 \times 10^{-6}$	8,040	6,150
				4,250	
$1,00 \times 10^{-5}$	101	51	$9,999 \times 10^{-6}$	8,230	8,150
				8,070	
$2,00 \times 10^{-5}$	204	103	$1,999 \times 10^{-5}$	15,50	14,25
				13,00	
$3,00 \times 10^{-5}$	309	105	$2,997 \times 10^{-5}$	16,70	17,75
				18,80	
$4,00 \times 10^{-5}$	417	108	$4,003 \times 10^{-5}$	18,00	19,30
				20,60	
$5,00 \times 10^{-5}$	526	109	$4,997 \times 10^{-5}$	21,10	23,25
				25,40	
$6,00 \times 10^{-5}$	638	112	$5,997 \times 10^{-5}$	27,00	27,35
				27,70	
$7,00 \times 10^{-5}$	753	115	$7,003 \times 10^{-5}$	28,90	27,20
				25,50	
$8,00 \times 10^{-5}$	870	117	$8,004 \times 10^{-5}$	26,30	24,80

Análise Voltamétrica da Ciprofloxacina – Aplicação a Medicamentos e a Remediação

				23,30	
9,00x10 <sup>-5</sup>	989	119	9,000x10 <sup>-5</sup>	25,70	26,85
				28,00	
1,00x10 <sup>-4</sup>	1111	122	9,999x10 <sup>-5</sup>	33,20	31,75
				30,30	
1,10x10 <sup>-4</sup>	1236	125	1,100x10 <sup>-4</sup>	33,80	31,70
				29,60	
1,20x10 <sup>-4</sup>	1364	128	1,200x10 <sup>-4</sup>	33,50	33,00
				32,50	
1,30x10 <sup>-4</sup>	1494	130	1,300x10 <sup>-4</sup>	34,50	34,30
				34,10	
1,40x10 <sup>-4</sup>	1628	134	1,400x10 <sup>-4</sup>	31,20	30,05
				28,90	
1,60x10 <sup>-4</sup>	1905	277	1,600x10 <sup>-4</sup>	42,60	45,85
				49,10	
1,80x10 <sup>-4</sup>	2195	290	1,800x10 <sup>-4</sup>	40,20	39,30
				38,40	
2,00x10 <sup>-4</sup>	2500	305	2,000x10 <sup>-4</sup>	41,00	42,20
				43,40	

O Vadicionar representa a diferença de volume necessária a adicionar para se ter a concentração pretendida.

**Limite de detecção e limite de quantificação por GCE**

**Tabela 21: Cálculo do limite de detecção e de quantificação por célula clássica.**

	x	y	x <sup>2</sup>	(x-med) <sup>2</sup>	
	<b>C<sub>CIP</sub> (mol/L)</b>	<b>-i<sub>p</sub> (A)</b>			
<b>1</b>	5,000E-06	6,150E-06	2,50E-11	6,612E-10	
<b>2</b>	1,000E-05	8,150E-06	1,00E-10	4,291E-10	
<b>3</b>	2,000E-05	1,425E-05	4,00E-10	1,148E-10	
<b>4</b>	3,000E-05	1,775E-05	9,00E-10	5,102E-13	
<b>5</b>	4,000E-05	1,930E-05	1,60E-09	8,622E-11	
<b>6</b>	5,000E-05	2,325E-05	2,50E-09	3,719E-10	
<b>7</b>	6,000E-05	2,735E-05	3,60E-09	8,577E-10	
<b>soma=</b>	<b>2,150E-04</b>	<b>1,162E-04</b>	<b>9,125E-09</b>	<b>2,521E-09</b>	
x med.=	3,07E-05		<b>correl=</b>	0,9903	
stdev slope (s <sub>b</sub> )=	0,02336	A L/mol	<b>slope(b)=</b>	0,3713	A L/mol
stdev intercept (s <sub>a</sub> )=	9,979E-07	A	<b>intercept(a)=</b>	5,195E-06	A
s <sub>y/x</sub> =	1,17296E-06				
<b>LOD=</b>	<b>9,48E-06</b>	Miller			
<b>LOQ=</b>	<b>3,16E-05</b>				

**Repetibilidade / Precisão intermédia por GCE**

**Tabela 22: Resultados da repetibilidade e precisão intermédia por célula clássica.**

Concentração (M)	Dia realização de ensaios					
	4 Junho		9 Junho		15 Junho	
	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)
$1,00 \times 10^{-5}$	11,20	11,34	12,50	12,32	13,80	13,80
	11,10		12,20		12,90	
	11,30		12,70		13,80	
	11,50		12,20		15,70	
	11,60		12,00		12,80	
$3,00 \times 10^{-5}$	19,20	19,66	21,40	21,32	17,20	18,78
	18,10		20,10		20,40	
	21,00		21,10		19,00	
	20,90		22,10		19,10	
	19,10		21,90		18,20	
$5,00 \times 10^{-5}$	28,00	26,76	23,20	25,36	22,50	23,66
	28,60		25,00		24,80	
	26,10		26,30		23,40	
	24,30		26,10		23,90	
	26,80		26,20		23,70	

**Adição padrão por GCE**

Os resultados obtidos para a curva adição padrão são apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23: Resultados da curva de adição padrão por GCE.**

Concentração CIP (mol/L)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)
0	11,90	12,80
	13,70	
$5,00 \times 10^{-6}$	15,20	15,20
$1,00 \times 10^{-5}$	18,60	19,15
	19,70	
$1,50 \times 10^{-5}$	22,60	22,80
	23,00	
$2,00 \times 10^{-5}$	26,40	26,70
	27,00	
$2,50 \times 10^{-5}$	28,00	28,90
	29,80	

**Limite de detecção e limite de quantificação por SPCE**

**Tabela 24: Limite detecção e de quantificação por SPCE.**

	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>x<sup>2</sup></b>	<b>(x-xmed)<sup>2</sup></b>	
	<b>C<sub>CIP</sub> (mol/L)</b>	<b>-i<sub>p</sub> (A)</b>			
<b>1</b>	1,000E-05	4,380E-05	1,00E-10	2,250E-10	
<b>2</b>	2,000E-05	5,840E-05	4,00E-10	2,500E-10	
<b>3</b>	3,000E-05	7,155E-05	9,00E-10	2,500E-10	
<b>4</b>	4,000E-05	8,350E-05	1,60E-9	2,250E-10	
<b>soma=</b>	<b>1,000E-04</b>	<b>2,573E-04</b>	<b>3,000E-9</b>	<b>5.000E-10</b>	
x med.=	2,50E-05		<b>correl=</b>	0,9990	
stdev slope (s <sub>b</sub> )=	0,04194	A L/mol	<b>slope(b)=</b>	1,3225	A L/mol
stdev intercept (s <sub>a</sub> )=	1,027E-06	A	<b>intercept(a)=</b>	3,125E-05	A
s <sub>y/x</sub> =	9,37750E-07				
<b>LOD=</b>	<b>2,13E-06</b>	Miller			
<b>LOQ=</b>	<b>7,09E-06</b>				

**Repetibilidade / Precisão intermédia por SPCE**

**Tabela 25: Resultados da repetibilidade e precisão intermédia por SPCE.**

Concentração (mol/L)	Dia realização de ensaios					
	26 Junho		30 Junho		1 Julho	
	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$i_p$ média ( $\mu$ A)
$1,00 \times 10^{-5}$	47,60	48,00	47,30	47,56	48,20	48,36
	47,10		47,63		49,00	
	49,00		47,70		48,70	
	48,50		47,65		47,60	
	46,90		47,51		48,30	
$3,00 \times 10^{-5}$	79,50	78,34	77,30	77,48	76,85	76,55
	77,40		77,50		77,20	
	77,80		77,80		75,00	
	78,50		77,20		77,20	
	78,50		77,58		76,50	
$4,00 \times 10^{-5}$	87,20	86,48	86,12	86,31	87,10	86,68
	86,30		86,22		86,50	
	85,90		86,30		86,30	
	86,00		86,43		85,70	
	87,00		86,48		87,80	

**Adição padrão por SPCE**

Os resultados obtidos para a curva de calibração são apresentados na Tabela 26:

**Tabela 26: Resultados da curva de calibração por SPCE.**

Concentração CIP (mol/L)	$i_p$ (μA)	$i_p$ média (μA)
$1,00 \times 10^{-5}$	43,80	43,80
$2,00 \times 10^{-5}$	58,40	58,40
$3,00 \times 10^{-5}$	70,00	71,55
	73,10	
$4,00 \times 10^{-5}$	83,50	83,50

De seguida foi adicionada uma quantidade conhecida da formulação farmacêutica. Os resultados obtidos da resposta da CIP são apresentados na tabela seguinte.

**Tabela 27: Resultados da curva de adição padrão por SPCE.**

Concentração CIP (mol/L)	$i_p$ (μA)	$i_p$ média (μA)
0	52,50	53,20
	53,80	
$5,00 \times 10^{-6}$	59,80	61,50
	63,20	
$1,00 \times 10^{-5}$	68,90	70,10
	71,30	
$1,50 \times 10^{-5}$	76,60	76,10
	75,60	
$2,00 \times 10^{-5}$	84,30	83,25
	82,20	
$2,50 \times 10^{-5}$	94,80	92,40
	90,00	

**Doseamento por SPCE**

**Tabela 28: Resultados obtidos de  $i_P$  da CIP nos ensaios de doseamento.**

	Concentração (mol/L)		
	$1,50 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$3,50 \times 10^{-5}$
	$i_P$ média ( $\mu A$ )		
Ensaio 1	52,4	64,3	80,8
Ensaio 2	48,2	64,1	80,2
Ensaio 3	51,1	66,7	81,4

## **Anexo II – Resultados da Remediação**

### **Preparação das soluções mãe de peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio e manganês**

Pretendia-se preparar soluções dos dois oxidantes a serem testados, peróxido de hidrogénio e permanganato de potássio, e uma solução de ião manganês de concentração  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L para todas as soluções.

De seguida apresenta-se os cálculos necessários para a preparação das soluções.

#### Peróxido de hidrogénio, $H_2O_2$

$$H_2O_2 \text{ 30\%} \rightarrow 30g_{H_2O_2} / 100g_{\text{solução}}$$

$$Mm=34.01g/mol$$

$$d=1.11$$

$$d = \frac{m}{V} \Leftrightarrow 1.11 = \frac{100g}{V} \Leftrightarrow V = 90,09L$$

$$C = \frac{n}{V} = \frac{m}{Mm \cdot V} = \frac{30}{34.01 \cdot 90.09 \times 10^{-3}} = 9,79mol / L$$

Para preparar uma solução de  $C=1,0 \times 10^{-2}$  mol/L:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \Leftrightarrow 9.79 \times V_i = 1.0 \times 10^{-2} \times 100.00 \times 10^{-3} \Leftrightarrow V_i = 102\mu L$$

Permanganato de potássio,  $\text{KMnO}_4$

Para a preparação da solução de  $\text{KMnO}_4$  partiu-se de uma solução anteriormente preparada de concentração  $0,020\text{mol/L}$ . Para preparar a solução de  $1,0 \times 10^{-2}\text{mol/L}$ :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \Leftrightarrow 0,020 \times V_i = 1,0 \times 10^{-2} \times 100,00 \times 10^{-3} \Leftrightarrow V_i = 50\text{mL}$$

Manganês,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Para preparar esta solução partiu-se do cloreto de manganês tetra hidratado de  $M_m=197,91\text{g/mol}$ . Para preparar a solução de  $1,0 \times 10^{-2}\text{mol/L}$ :

$$C = \frac{m}{M_m V} \Leftrightarrow 1,0 \times 10^{-2} = \frac{m}{197,91 \times 100,00 \times 10^{-3}} \Leftrightarrow m = 0,19791\text{g}$$

$m_{\text{pesada}} 0,19779\text{g}$

$$C_{\text{exacta}} = \frac{0,19779}{197,91 \times 100,00 \times 10^{-3}} = 9,994 \times 10^{-3}\text{mol/L}$$

**Ensaio com o permanganato de potássio.**

A concentração CIP usada foi de  $3,0 \times 10^{-5}$  mol/L. Os resultados dos ensaios são apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29: Ensaio realizado com permanganato ( $C_{CIP}=3,0 \times 10^{-5}$  mol/L).**

Ensaio1		Ensaio2	
Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu A$ )	Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu A$ )
2	0,00	1	3,32
5	0,00	6	0,00
11	0,00	10	0,00
42	0,00	15	0,00
		43	0,00

Depois optou-se por mudar a concentração da CIP para  $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L para ver se esta se degrada tão rapidamente como nos ensaios anteriormente realizados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30: Ensaio com permanganato ( $C_{CIP}=4,0 \times 10^{-5}$  mol/L).**

Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu A$ )
1	14,10
4	0,00
8	0,00

**Ensaio com o peróxido de hidrogênio.**

A concentração CIP usada é de  $3,0 \times 10^{-5}$  mol/L. Os resultados dos ensaios são apresentados na Tabela 31.

**Tabela 31: Ensaio realizado com peróxido ( $C_{\text{ciprofloxacina}} = 3,0 \times 10^{-5}$  mol/L).**

Ensaio1		Ensaio2	
Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )	Tempo decorrido (min)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )
8	13,00	6	19,50
21	21,60	12	23,20
26	26,70	18	22,70
38	22,40	26	36,70
52	17,90	30	19,60
65	27,20	36	15,20
74	35,20	47	21,10
84	35,10	54	29,50
		65	27,80
		80	13,00
		93	17,70
		99	21,00

**Anexo III - Ficha segurança da CIP**

**Tabela 32: Ficha segurança do antibiótico em estudo, a CIP.**

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/PREPARAÇÃO E DA SOCIEDADE/EMPRESA				
Nome do produto	:	Ciprofloxacín		
Referência do Produto	:	17850		
Marca	:	Fluka		
Companhia	:	Sigma-Aldrich Quimica SA Apt Correos 161 P-2810 ALCOBENDAS-MADRID		
Telefone	:	+351 1-661-9977		
Número de Fax	:	+351 1-661-9642		
Número de Telefone de Emergência	:	+44-(0)-208 762 8322		
Email endereço	:	eurtechserv@sial.com		
2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS				
Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a Directiva 67/548/CEE.				
3. COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES				
Sinónimos	:	Ciprobay		
Formula	:	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$		
Peso molecular	:	331,34 g/mol		
Nº CAS	No. CE	No. de Index	Classificação	Concentração
<b>Ciprofloxacín hydrochloride</b>				
85721-33-1	-	-	-	-
4. PRIMEIROS SOCORROS				
<b>Se for inalado</b> Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, aplicar a respiração artificial.				
<b>No caso dum contacto com a pele</b> Lavar com sabão e muita água.				
<b>No caso dum contacto com os olhos</b> Lavar os olhos com água como precaução.				
<b>Se for engolido</b> Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água.				
5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO				
<b>Meios adequados de extinção</b> Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.				
<b>Equipamento especial de protecção a utilizar pelo pessoal de combate a incêndio</b> Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.				
Fluka - 17850		www.sigma-aldrich.com		Página 1 of 4

<p><b>6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS</b></p> <p><b>Precauções individuais</b> Evitar a formação de poeira.</p> <p><b>Precauções ambientais</b> Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.</p> <p><b>Métodos de limpeza</b> Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.</p>																					
<p><b>7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM</b></p> <p><b>Manuseamento</b> Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de protecção preventiva contra incêndio.</p> <p><b>Armazenagem</b> Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Armazenar em local fresco.</p>																					
<p><b>8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/PROTECÇÃO PESSOAL</b></p> <p><b>Protecção individual</b></p> <p><b>Protecção respiratória</b> Não é necessária protecção respiratória. Se desejar protecção contra níveis de pó incomodativos, use máscaras de pó do tipo N95 (E.U.A.) ou do tipo P1 (EN 143). Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).</p> <p><b>Protecção das mãos</b> Para um contacto prologado ou repetitivo pôr luvas de protecção.</p> <p><b>Protecção dos olhos</b> Óculos de segurança</p> <p><b>Medidas de higiene</b> Prática geral de higiene industrial.</p>																					
<p><b>9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS</b></p> <p><b>Aspecto</b></p> <table> <tr> <td>Estado físico</td> <td>pó</td> </tr> <tr> <td>Cor</td> <td>amarelo claro</td> </tr> </table> <p><b>Dados de segurança</b></p> <table> <tr> <td>pH</td> <td>3,0 - 4,5</td> </tr> <tr> <td>Ponto de fusão</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Ponto de ebulição</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Ponto de inflamação</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Temperatura de ignição</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Limites de explosão, inferior</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Limite de explosão, superior</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> <tr> <td>Hidrossolubilidade</td> <td>dados não disponíveis</td> </tr> </table>		Estado físico	pó	Cor	amarelo claro	pH	3,0 - 4,5	Ponto de fusão	dados não disponíveis	Ponto de ebulição	dados não disponíveis	Ponto de inflamação	dados não disponíveis	Temperatura de ignição	dados não disponíveis	Limites de explosão, inferior	dados não disponíveis	Limite de explosão, superior	dados não disponíveis	Hidrossolubilidade	dados não disponíveis
Estado físico	pó																				
Cor	amarelo claro																				
pH	3,0 - 4,5																				
Ponto de fusão	dados não disponíveis																				
Ponto de ebulição	dados não disponíveis																				
Ponto de inflamação	dados não disponíveis																				
Temperatura de ignição	dados não disponíveis																				
Limites de explosão, inferior	dados não disponíveis																				
Limite de explosão, superior	dados não disponíveis																				
Hidrossolubilidade	dados não disponíveis																				
Fluka - 17850	www.sigma-aldrich.com																				
Página 2 of 4																					

<p><b>10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE</b></p> <p><b>Estabilidade em armazenamento</b> Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.</p> <p><b>Matérias a evitar</b> Agentes oxidantes fortes</p> <p><b>Produtos de decomposição perigosos</b> Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Óxidos de carbono, óxidos de azoto (NOx), Ácido fluorídrico</p>								
<p><b>11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA</b></p> <p><b>Toxicidade aguda</b> DL50 Oral - ratazana - &gt; 2.000 mg/kg DL50 intravenoso - ratazana - 207 mg/kg Observações: Comportamento: alterações do ciclo de sono (incluindo alterações no reflexo geral de postura). Comportamento: Sonolência (diminuição da actividade geral)</p> <p><b>Irritação ou corrosão</b> dados não disponíveis</p> <p><b>Sensibilização</b> dados não disponíveis</p> <p><b>Exposição crónica</b></p> <p>IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.</p> <p>Genotoxicidade in vitro - Humano - linfócito Danificação do DNA</p> <p>Genotoxicidade in vitro - Humano - linfócito Síntese não prevista de DNA</p> <p>Genotoxicidade in vitro - Hamster - Pulmões Teste do micronúcleo</p> <p>Genotoxicidade in vitro - Hamster - Pulmões Análises citogenéticas</p> <p>Genotoxicidade in vivo - rato - intraperitoneal Análises citogenéticas</p> <p>Genotoxicidade in vivo - rato - intraperitoneal Troca de cromatídeos homólogos</p> <p><b>Efeitos potenciais sobre a saúde</b></p> <table><tr><td><b>Inalação</b></td><td>Pode ser perigoso se for inalado. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.</td></tr><tr><td><b>Pele</b></td><td>Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Pode causar uma irritação da pele.</td></tr><tr><td><b>Olhos</b></td><td>Pode causar uma irritação dos olhos.</td></tr><tr><td><b>Ingestão</b></td><td>Pode ser perigoso se for engolido.</td></tr></table> <p><b>Informação adicional</b> RTECS: VB1993800</p>	<b>Inalação</b>	Pode ser perigoso se for inalado. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.	<b>Pele</b>	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Pode causar uma irritação da pele.	<b>Olhos</b>	Pode causar uma irritação dos olhos.	<b>Ingestão</b>	Pode ser perigoso se for engolido.
<b>Inalação</b>	Pode ser perigoso se for inalado. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.							
<b>Pele</b>	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Pode causar uma irritação da pele.							
<b>Olhos</b>	Pode causar uma irritação dos olhos.							
<b>Ingestão</b>	Pode ser perigoso se for engolido.							
<p><b>12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA</b></p> <p><b>Informação sobre eliminação (persistência e degradabilidade)</b></p> <p>Fluka - 17850 <span style="margin-left: 200px;">www.sigma-aldrich.com</span> <span style="float: right;">Página 3 of 4</span></p>								