

Desenvolvimento e validação de método para quantificação simultânea de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina em urina humana

Development and validation of an analytical method for the simultaneous quantification of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in human urine

Priscilla Garozi Zanchetta¹, Angelina Pena², Ricardo Franci Gonçalves³

RESUMO

Processos de tratamentos têm sido alvo de estudos com a finalidade de promover a remoção dos fármacos na urina humana de forma a garantir a segurança ambiental da utilização dessa como fertilizante na agricultura. Neste artigo foi desenvolvido e validado um método de CLAE-DF para a determinação simultânea de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina na urina humana. O método proposto descreve uma alternativa eficaz para a determinação de resíduos de fluoroquinolonas, eliminando o passo de limpeza. Além disso, o método proposto demonstrou ser seletivo, com boa linearidade ($r > 0,99$), sensibilidade, precisão (80% a 107%) e repetitividade. Este método mostra ser adequado para análises de rotina (de baixo custo, simples, e utilizando pequeno volume de solventes) para abordagens ecológicas.

Palavras-chave: fluoroquinolonas; validação; CLAE-DF.

ABSTRACT

Treatment processes have been the focus of studies aiming at promoting the removal of drugs in human urine in order to ensure environmental safety using it as a fertilizer in agriculture. So, an HPLC-FD method for the simultaneous determination of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in human urine was developed and validated. The proposed method describes an efficient alternative for the determination of fluoroquinolone residues by eliminating the clean-up step. Moreover, the proposed method proved to be selective, with good linearity ($r > 0.99$), sensitivity, accuracy (80% to 107%) and repeatability. This method shows to be suitable for routine analyses (simple, low price and using a small volume of solvents) for ecological approaches.

Keywords: fluoroquinolones; validation; HPLC-FD.

INTRODUÇÃO

A urina contém macronutrientes que se encontram na forma ideal para serem aproveitados pelas plantas: o nitrogênio na forma de ureia, o fósforo como ortofosfato e o potássio como íon livre, além de alta qualidade dos nutrientes, ela é uma alternativa de baixo custo aos fertilizantes comerciais (ECOSANRES, 2008). Um dos fatores importantes que deve ser levado em consideração nas ações de saneamento ecológico, com vista à utilização da urina humana como fertilizante na agricultura, consiste no fato da excreção urinária ser uma importante via de eliminação de fármacos.

Estudos de ecotoxicidade relativos à exposição a medicamentos utilizados na medicina humana concluíram que alguns fármacos, como o ibuprofeno, a fluoxetina, o diclofenaco, o propranolol e o metoprolol possuem toxicidade aguda elevada para as espécies aquáticas

estudadas, sendo a fluoxetina a que apresenta maior toxicidade (DORNE *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010).

Foi também demonstrada a relação estreita entre a presença de resíduos de antibióticos no ambiente, a emergência e a propagação de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos na população mundial, o que constitui, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um dos principais problemas de saúde pública do século XXI (OMS, 2000).

Os antibióticos da classe das fluoroquinolonas (FQs) pertencem a uma classe de agentes antibacterianos com amplo espectro de atividade contra organismos Gram positivos e Gram negativos (SOUZA, 2005). As FQs em geral são bactericidas em baixas concentrações e possuem um espectro de ação mais abrangente, uma maior difusão para os tecidos incluindo os líquidos intracelulares e uma menor

¹Farmacêutica-Bioquímica, Especialista em Farmacologia, Mestre e Doutora em Engenharia Ambiental. Departamento de Engenharia Ambiental, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Vitória (ES), Brasil.

²Farmacêutica. Doutora em Farmácia pela Universidade de Coimbra. Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra - Portugal.

³Engenheiro Civil e Sanitarista. Pós-graduado em Engenharia de Saúde Pública. Doutor em Engenharia do Tratamento e Depuração de Águas - INSA de Toulouse, França. Professor do DEA e do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da UFES - Vitória (ES), Brasil.

Endereço para correspondência: Priscilla Garozi Zanchetta - Rua Maria dos Santos Cunha, 85/304-A - Jardim Camuri - 29090-420 - Vitória (ES), Brasil - E-mail: priscillagz@gmail.com

Recebido: 28/03/13 - **Aceito:** 06/04/15 - **Reg. ABES:** 114433

toxidez. A principal via de eliminação das FQs é a urinária, tanto de forma inalterada como na forma de metabólitos (ESPINOSA-MANSILLA, 2006) (Figura 1).

A presença de resíduos de FQs na urina é um dos fatores que precisam ser criteriosamente avaliados antes da sua recomendação como fertilizante, uma vez que a sua presença no ambiente constitui um potencial risco (SEIFRTOVÁ *et al.*, 2009).

É de primordial importância o desenvolvimento de novos procedimentos de tratamento da urina humana, que devem contemplar os diferentes grupos de medicamentos existentes, inclusive dos antibióticos do grupo das FQs, e adequar o tipo de tratamento com o objetivo de prevenir efeitos nocivos de eventuais contaminações.

Alguns processos de tratamentos têm sido alvo de estudos com a finalidade de promover a remoção dos produtos farmacêuticos na urina humana: ozonização (GULYAS *et al.*, 2007), eletrodialise (PRONK *et al.*, 2006), *steam stripping*, destilação a vácuo, irradiação UV (TETTENBORN *et al.*, 2007), contudo, os estudos são ainda muito escassos.

Para a correta avaliação e o controle da presença de FQs na urina humana é relevante o desenvolvimento de metodologias analíticas, sensíveis, seletivas, exatas e precisas para a identificação e quantificação desses resíduos nessa matriz.

Na literatura encontram-se descritas várias metodologias analíticas para a determinação de FQs em diversas matrizes (KROL *et al.*, 1995; PENA *et al.*, 2010; SEIFRTOVÁ *et al.*, 2009). Entre as técnicas utilizadas para a determinação de resíduos de FQs incluem-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fluorimétrica (DF) e acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM).

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica sustentável para determinação de antibióticos do grupo das FQs, especificamente, ofloxacina (OFLO) (ácido (\pm)-9-fluoro-2, 3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido [1,2,3-de]-1, 4-benzoxazino-6-carboxílico), norfloxacin (NOR) (ácido (1-etil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico) e ciprofloxacina (CIPRO)

(1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinil-quinolina-3-ácido carboxílico) via injeção direta, eliminando a etapa de purificação, por CLAE-DF na urina humana.

Uma vez que as FQs apresentam fluorescência, a detecção fluorimétrica proporciona maior seletividade, constituindo um poderoso método analítico na análise de resíduos, principalmente quando há a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar as interferências presentes na amostra. Constitui também uma alternativa à análise por CLAE-EM, que exige um equipamento muito dispendioso, nem sempre disponível num laboratório de análise.

O método analítico proposto é simples, rápido e seguro, apresentando boa recuperação e avaliação da precisão adequada à determinação das FQs em estudo na matriz urina humana. Deste modo, será possível implementar soluções corretas, de forma a garantir a segurança ambiental e humana da utilização da urina humana como fertilizante na agricultura.

METODOLOGIA

Instrumentação e condições cromatográficas

O sistema CLAE é constituído por uma bomba Gilson modelo 305 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Califórnia, EUA) com um *loop* de 20 μ L, um detector fluorimétrico LabAlliance e um integrador SP 4270 (Hewlett Packard, Filadélfia, EUA).

Foi efetuada a análise com eluição isocrática com uma fase móvel constituída por uma solução de 0,025 mol.L⁻¹ de ácido fosfórico (ajustada ao pH 3,0 com tetrabutylamônio —TBA), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (910:70:20; v/v/v), a um fluxo de 1,4 mL.min⁻¹, sendo o volume de injeção de 20 μ L.

A coluna utilizada foi uma Phenomenex Phenosphere ODS - C18 100, 250 x 4,6 mm (5 μ m) com coluna de guarda G-ODS(4) octadecil de 4 mm de diâmetro interno.

Os comprimentos de onda, de emissão e de excitação foram otimizados através da obtenção do espectro de uma solução padrão com as

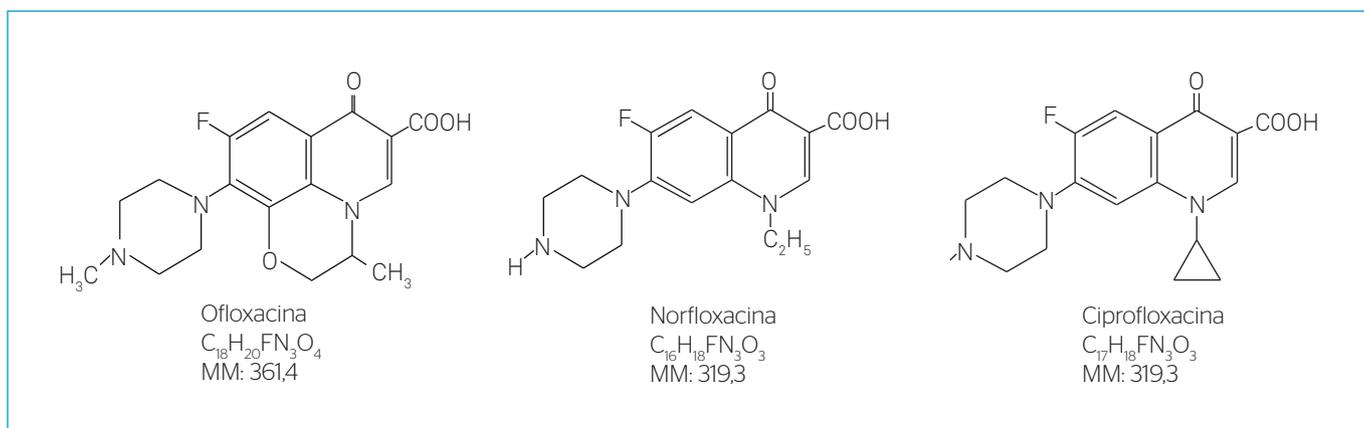


Figura 1 - Estrutura química da ofloxacina, norfloxacin e ciprofloxacina.

respectivas FQs. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão selecionados foram de 278 e 450 nm, respectivamente. A banda espectral de excitação e emissão foi de 10 nm.

Reagentes e materiais

A OFLO, a CIPRO e a NOR foram adquiridas da Sigma-Aldrich Steinheim (Alemanha). O MeOH e a ACN grau HPLC foram obtidos de Carlo Erba (Milão, Itália) e o ácido fosfórico 85% de RPE-ACS Merck (Alemanha). A centrífuga utilizada foi o modelo 3-16 K da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), os filtros de membrana são NL16, 0,2 μm Ø 50 mm e filtro para seringa de 0,45 μm , ambos da Milipore (EUA).

Amostragem

As amostras de urina humana foram recolhidas em frascos estéreis, próprios para coleta de urina com capacidade de 60 mL, entre professores, alunos e técnicos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, aos quais foi solicitado o preenchimento de um questionário a fim de avaliar a medicação utilizada por cada doador. As amostras de urina humana coletadas foram misturadas e homogeneizadas. As análises foram realizadas com urina fresca, logo após o recolhimento, acidificadas a pH 2,0.

Extração da amostra

Uma alíquota de 4 mL de cada amostra foi transferida para um tubo de centrifugação de vidro âmbar, com mais 6 mL de H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹, agitada em vórtex e levada ao banho de ultrassom durante 5 min. Posteriormente procedeu-se à centrifugação durante 15 min a 4.444 g, a 5 °C. O sobrenadante foi filtrado através de membrana filtrante de 0,45 μm antes da injeção no sistema cromatográfico. O tempo total de corrida foi de 20 min.

Soluções estoque de fluoroquinolonas

As soluções estoque de OFLO, NOR e CIPRO 1 mg.mL⁻¹ foram preparadas dissolvendo-se 50 mg do padrão respectivo em ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ num balão de vidro âmbar de 50 mL. As soluções estoque foram armazenadas a 4°C.

Validação do método

Para validar essa metodologia analítica foi necessário observar condições essenciais: inexistência de interferentes (seletividade), proporcionalidade entre a resposta da área de cada composto e a concentração do mesmo (linearidade), a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), a recuperação e a precisão dos resultados através da repetitividade e da precisão intermediária (ALVES *et al.*, 2010; ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

RESULTADOS

Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas basearam-se no método de Pena *et al.* (2010), ao qual foram efetuadas modificações. Neste trabalho, a eluição das FQs em estudo na matriz urina humana foi obtida com a fase móvel constituída por uma solução de H_3PO_4 0,025 mol.L⁻¹, ajustada ao pH 3,0 com TBA, MeOH e ACN nas seguintes proporções, 910:70:20 (v/v/v). Conforme a metodologia descrita anteriormente, o sistema escolhido foi a CLAE-DF para a separação e determinação das três FQs nas amostras de urina.

Antes de chegar à fase móvel (FM) ideal, outras fases móveis foram utilizadas. No total foram testados seis tipos de fases móveis (FM1, FM2, FM3, FM4, FM5 e FM6).

Para iniciar a otimização do método, a primeira FM testada (FM1) foi a mesma utilizada por Pena *et al.* (2010), constituída por tampão fosfato ajustado ao pH 3,0 com TBA e MeOH, na proporção 890:110 (v/v), respectivamente. Como essa FM não foi eficiente na separação das FQs na matriz urina humana, testou-se o aumento da porcentagem de MeOH, e foram testadas mais três fases móveis (885:115; 880:120 e 870:130 v/v).

Após os testes com essas quatro FM, não se obteve uma boa separação para a OFLO e decidiu-se utilizar uma FM com ACN, alterando a seletividade da FM e mantendo a polaridade da mesma constante (COLLINS *et al.*, 2006).

A FM 5 testada era constituída de tampão fosfato ajustado ao pH 3,0 com TBA, MeOH e ACN, na proporção 920:70:10 (v/v/v), mas como a quantidade de ACN ainda não foi suficiente para uma boa determinação da OFLO, alterou-se mais uma vez a FM para a proporção 910:70:20 (v/v/v), para a qual se obteve melhores resultados. As separações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente (15 a 20°C) e o fluxo de injeção foi de 1,4 mL.min⁻¹.

A variação no tempo de retenção (t_r) foi estudada nas soluções padrão injetadas no mesmo dia e em dias diferentes. O t_r médio obtido foi de 7,53; 11,11 e 13,06 minutos para OFLO, NOR e CIPRO, respectivamente, com um coeficiente de variação (CV) máximo de 5,21% para a OFLO, 3,95% para a NOR e 4,43% para a CIPRO, obtidos a partir de 20 injeções de diferentes soluções de trabalho ao longo do mesmo dia (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

No entanto, os resultados deste estudo mostram que essa variação é devida essencialmente à flutuação da temperatura do laboratório, o que influencia na viscosidade da fase móvel, e consequentemente a pressão da coluna e os t_r das FQs. Em outros estudos, será essencial usar um forno para colunas, para proceder à análise cromatográfica em temperatura controlada.

As FQs possuem propriedades fluorescentes e podem ser efetivamente detectadas por fluorimetria, uma vez que a intensidade da emissão de fluorescência é diretamente proporcional à concentração. O espectro de fluorescência consiste numa banda larga dentro de 350 a 400 nm para as quinolonas ácidas e 440 a 500 nm para as quinolonas

piperezínicas. Outros estudos apresentam as excitações/emissões utilizadas (Tabela 1). Os comprimentos de onda na faixa de 277 a 490 nm são os que possuem melhores resoluções para as FQs segundo estudo realizado por Espinosa-Mansilla *et al.* (2006). Os comprimentos de onda selecionados neste estudo correspondem a um comprimento de onda de excitação 278 nm e um comprimento de onda de emissão 450 nm, os mesmos comprimentos de onda também foram utilizados por Seifrtová *et al.* (2009) e Pena *et al.* (2010) para as fluoroquinolonas.

A fluorescência depende fortemente do pH do meio, sendo a maior intensidade de fluorescência obtida em pH baixo (de 2,5 a 4,5), o que está de acordo com a fase móvel escolhida (pH 3,0) (MIRANDA, 2001). Com esses valores de pH, a forma predominante das quinolonas piperezínicas é a catiônica (ZHANG *et al.*, 2009; PEREIRA, 2009; PICO; ANDREU, 2007; VAZQUEZ-ROIG *et al.*, 2010).

A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribui ao composto propriedades anfotéricas, podendo, desse modo, existir mais do que uma espécie presente em solução, dependendo do pH. Tal possibilidade decorre da protonação/desprotonação desses grupos, fazendo com que as quinolonas possam existir sob as formas catiônica, aniônica ou zwitteriônica.

Otimização do método de extração

Tendo como objetivo principal desenvolver um método de extração o mais simples possível, na otimização da quantidade de urina humana a ser utilizada na preparação da amostra foram testados vários volumes. Inicialmente partimos de um volume maior de amostra para aumentar a sensibilidade do método, mas devido à influência de interferentes presentes na urina, foi necessário reduzi-lo.

Nos estudos de otimização, o volume inicial de urina foi de 15 mL e a desproteinização da amostra foi testada com dois ácidos diferentes, ácido clorídrico e ácido sulfúrico. Após a desproteinização, procedeu-se com a agitação em vórtex (1 min) da amostra e banho de ultrassom (5 min), seguida de centrifugação por 5 min.

Em relação ao agente desproteinizante, o ácido sulfúrico proporcionou uma melhor separação cromatográfica, enquanto que os extratos com o ácido clorídrico apresentavam efeito de cauda (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Assim, o volume final utilizado foi de 4,0 mL de urina acidificada a pH 2,0 com ácido sulfúrico.

Tabela 1 - Comprimento de excitação/emissão para fluoroquinolonas utilizados por outros autores.

Autores	Comprimento de excitação/emissão utilizado para fluoroquinolonas
Espinosa-Mansilla <i>et al.</i> (2006)	277/490 nm
Krol, Beck e Benham (1995)	277/418 nm
Marazuela e Moreno-Bondi (2004)	280/440 nm
Vybiralová <i>et al.</i> (2005)	280/446 nm

De modo a maximizar a recuperação das três FQs, procedemos ao estudo de vários tempos de extração em banho de ultrassom. Os valores mais elevados foram encontrados ao fim de 5 min, e o aumento do tempo de extração não correspondeu a um aumento na percentagens de recuperação. Devido aos interferentes presentes no extrato, e para minimizar o efeito de matriz, procedemos a um estudo de otimização da temperatura e força de centrifugação, fatores importantes na eliminação dos interferentes. Nessa fase, foram executados vários ensaios a diferentes forças de centrifugação e a diferentes temperaturas, de modo a avaliar a eliminação do maior número de interferentes. Assim, aumentando a força centrífuga a 4.444 g, procedeu-se à apreciação do efeito da temperatura, a 20°C, 10°C e a 5°C. Assim, e de acordo com o esperado, os melhores resultados foram obtidos a 5°C (ZHAO *et al.*, 2007).

Antes da injeção no CLAE-DE, as amostras foram filtradas através de filtro de membrana (0,45 mm).

Validação

Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

De modo a avaliar os interferentes presentes na amostra foram efetuados ensaios em branco, em um número de amostras representativas da urina humana (n=15). A Figura 2A ilustra uma amostra de um branco na matriz urina, que demonstra a ausência de interferentes nos t_R das FQs em estudo nas amostras analisadas segundo as condições de trabalho descritas, indicando a seletividade da metodologia proposta.

A Figura 2B destaca o cromatograma obtido com a urina fortificada com as três fluoroquinolonas durante as análises do método.

Linearidade

A curva de calibração foi preparada com uma amostra de urina em branco com padrões de solução das três FQs diferenciando no intervalo de concentração, que foi de 1 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para NOR e CIPRO e 1 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para OFLO.

Os coeficientes de correlação da curva (r^2) foram de 0,997; 0,998 e 0,998 para OFLO NOR e CIPRO, respectivamente. Observa-se que as três FQs apresentaram respostas lineares para as faixas de concentrações utilizadas no estudo, estando de acordo com as normas exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação

Os LD foram estabelecidos com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y nas três curvas de calibração e IC é o coeficiente

angular da curva analítica. O LQ foi calculado pelo uso de 10 vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular (ANVISA, 2003).

Os LD obtidos para as três FQs foram de $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o LQ obtido segundo tais condições de trabalho foi de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

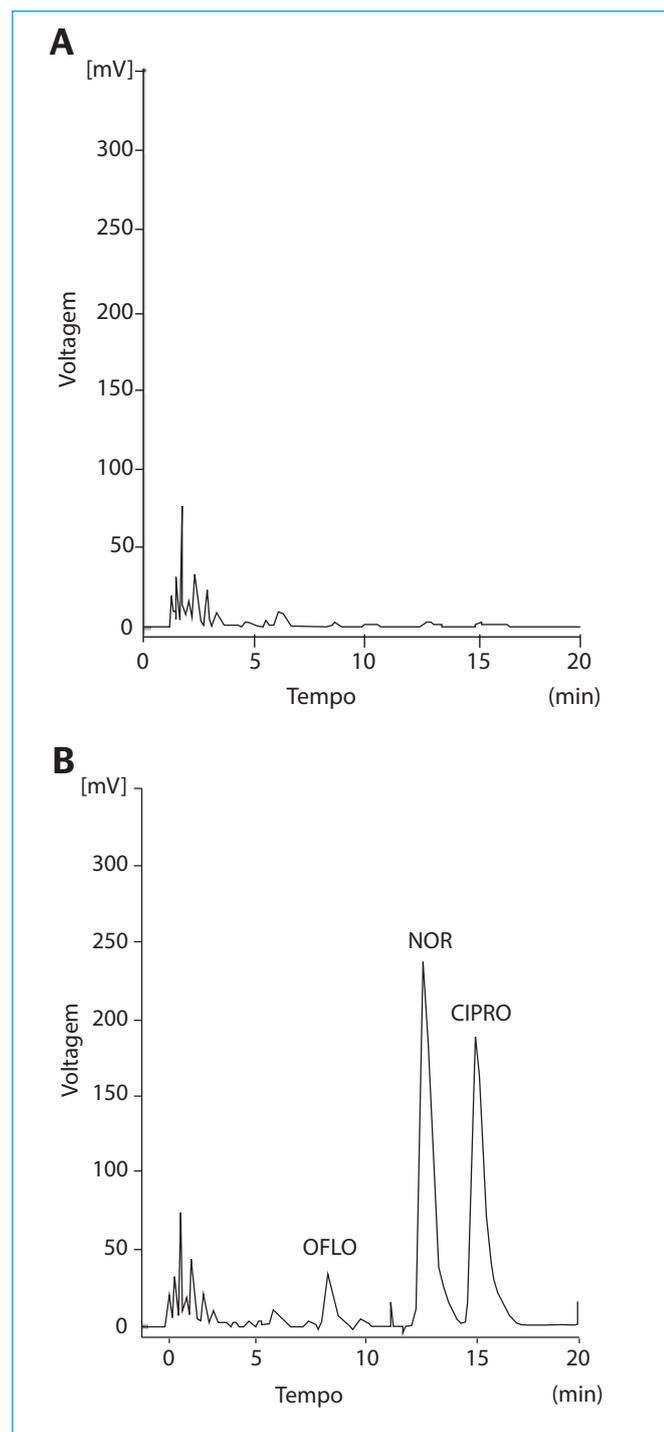


Figura 2 - Cromatogramas. (A) amostra do ensaio em branco com urina humana. (B) ensaio de fortificação com 4 mg.mL^{-1} de cada fluoroquinolona estudada na urina (ofloxacin, norfloxacin e ciprofloxacin).

Recuperação

A recuperação foi para 5 níveis de fortificação, efetuando 5 ensaios, entre 1 a $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a OFLO, e entre 1 a $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a NOR e CIPRO.

As porcentagens de recuperação obtidas a partir de amostras de urina fortificadas com as FQs atingiram valores elevados, variando de 80 a 107% com CV relativamente baixo (Tabela 2). Esses valores demonstraram que o método está de acordo com o estabelecido pela ANVISA (ANVISA, 2003), que determina que as porcentagens de recuperação devem estar próximas de 100% admitindo-se valores de CV menores ou iguais a 20% estabelecidos para os níveis de concentração em estudo.

Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade foi avaliada por injeção, no mesmo dia, das soluções referidas em triplicata ($n=3$) e a precisão intermediária durante três dias consecutivos (ANVISA, 2003).

A repetitividade e a precisão intermediária foram estabelecidas para as análises das amostras de urina fortificadas a três níveis de fortificação ($1, 10$ e $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para OFLO e $1,4$ e $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para NOR e CIPRO) (Tabela 3).

A repetitividade, expressa em CV, foi inferior a 6% (Tabela 3). Os valores de precisão intermediária, para os três níveis de fortificação, variaram entre 1,65 e 8,94% para a OFLO, 2,29 a 5,24% para a NOR e 2,12 a 5,96% para a CIPRO. Esses resultados provam que o método proposto apresenta uma avaliação da precisão adequada para a análise desses antibióticos em amostras de urina, uma vez que os valores de CV obtidos foram inferiores a 6,0%. A precisão intermediária se mostrou semelhante à repetitividade, apresentando uma tendência de diminuição à medida que os níveis de fortificação aumentavam com valores de CV inferiores a 8,9%. Os valores estão de acordo com as características da amostra. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1,0 a 2,0%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

DISCUSSÃO

Na literatura encontra-se descrito um número significativo de metodologias analíticas para a quantificação das FQs em diversas matrizes, como em plasma humano (LIANG; KAYS; SOWINSKI, 2002; DE SMET *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2010), em tecidos de animais (PEREIRA, 2009; POSYNIK; ZMUDZKI; SEMENIUK, 2001; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2002) e em amostras ambientais (RAMOS PAYÁN *et al.*, 2011; PENA *et al.*, 2010; SEIFRTOVÁ *et al.*, 2008).

No que se refere à matriz urina humana, os métodos utilizados por Mascher e Kikuta (1998) e Espinosa-Mansilla *et al.* (2006) também utilizaram CLAE-DF para análise de FQs. Mascher e Kikuta (1998)

estudaram apenas a identificação de NOR, enquanto Espinosa-Mansilla *et al.* (2006) procederam à quantificação simultânea de mais de uma FQ, porém sem contemplar a determinação de CIPRO. Dentre as FQs utilizadas hoje, a CIPRO é a mais importante e está entre os 343 medicamentos mais utilizados no mundo, estando presente no Formulário Terapêutico Nacional Renome 2010.

O método de Ballestreros *et al.* (2003) determinou simultaneamente OFLO, NOR e CIPRO em urina por extração em fase sólida em CLAE-IES-EM (ionização por *electrospray*). Eles conseguiram um limite de detecção bastante baixo, 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NOR, 21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OFLO e 17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para CIPRO, mas utilizando um método mais caro e mais trabalhoso do que o utilizado por este trabalho e por Espinosa-Mansilla *et al.* (2006). Já Goyal, Rana e Chasta (2012) utilizaram um método de detecção eletroquímica que é um método menos seletivo do que a CLAE e o método foi desenvolvido apenas para a NOR.

O presente trabalho propôs uma metodologia analítica simples, sem necessidade de recorrer à etapa de *clean-up* que geralmente exige o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e outros procedimentos, como a extração em fase sólida. Essas simplificações contribuíram para a facilidade de operação, o baixo custo do método desenvolvido, a rapidez da análise laboratorial e a redução do consumo de solventes. A eliminação de interferentes e a obtenção de extratos límpidos foram alcançadas pela otimização da centrifugação, aumentando a força centrífuga (g) e reduzindo a temperatura de centrifugação, como foi descrito anteriormente. O método foi validado e mostrou-se seletivo, preciso e com boa recuperação para a determinação simultânea das três FQs em estudo na matriz urina humana. Os resultados obtidos através da análise de regressão linear das curvas de calibração obtidas para a matriz demonstram

boa linearidade para todos os três compostos analisados. A análise desses dados permite inferir que os requisitos de linearidade exigidos pela ANVISA foram atendidos, já que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2) deve ser igual a 0,99 (ANVISA, 2003).

A detecção fluorimétrica permitiu um maior grau de seletividade, constituindo um poderoso método analítico na análise de resíduos de FQs, principalmente quando à necessidade de reduzir as interferências nas matrizes, uma vez que existem poucos compostos naturais que possuem fluorescência (GIL, 2009; GOLET *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2010; SEIFRTOVÁ *et al.*, 2008). A fluorescência das FQs permite a sua detecção seletiva, podendo alcançar limites de detecção bastante baixos utilizando uma metodologia mais acessível e mais barata relativamente à espectrometria de massa, permitindo a identificação e quantificação simultânea de OFLO, NOR e CIPRO na urina humana (PENA *et al.*, 2010; PEREIRA, 2009).

Tabela 3 - Repetitividade e precisão intermediária para ofloxacina, norfloxacin e ciprofloxacina em amostra de urina humana.

Fluoroquinolonas	Nível de fortificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão intermediária (coeficiente de variação (%))	Repetitividade (coeficiente de variação %)
Ofloxacina	1	78,30	1,65	2,89
	10	93,95	7,48	4,37
	20	81,18	8,94	4,69
Norfloxacin	1	81,58	2,29	3,14
	4	97,87	5,24	3,91
	10	92,29	5,22	3,97
Ciprofloxacina	1	74,20	2,12	2,59
	4	96,27	5,72	6,03
	10	92,33	5,96	4,11

Tabela 2 - Recuperação para ofloxacina, norfloxacin e ciprofloxacina em amostra de urina humana.

Fluoroquinolonas	Concentração adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Coeficiente de variação (%)	Recuperação (%)
Ofloxacina $r^2=0,997$	1	0,81	0,13	16,41	81,16
	2	1,72	0,20	11,65	85,85
	4	4,01	0,01	0,22	100,31
	10	10,74	0,52	4,86	107,39
	15	15,22	0,15	1,01	101,45
	20	19,50	0,35	1,8	97,52
Norfloxacin $r^2=0,998$	1	0,82	0,13	15,45	82,06
	2	1,99	0,01	0,33	99,53
	4	4,28	0,20	4,67	107,07
	6	6,00	0,00	0,03	99,96
	10	9,91	0,07	0,66	99,08
Ciprofloxacina $r^2=0,998$	1	0,80	0,14	17,16	80,47
	2	2,13	0,09	4,38	106,60
	4	4,19	0,13	3,19	104,72
	6	5,89	0,08	1,29	98,20
	10	9,98	0,01	0,12	99,82

CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido e validado comprovou ser simples, seletivo, preciso e com boa recuperação para a determinação simultânea das três FQs em estudo, OFLO, NOR e CIPRO, em amostras de urina humana.

A metodologia analítica proposta apresenta-se como importante ferramenta analítica na avaliação do comportamento das FQs em estudo na urina humana, para a avaliação da sua remoção durante os diferentes tipos de tratamentos propostos, com vista à sua utilização como fertilizante.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.B.; SILVA, M.G.; CARVALHO, P.R.N.; VISSOTTO, L.C.; BRAGAGNOLO, N. (2010) Validação e estimativa da incerteza de método para análise de licopeno e β -caroteno em polpa de tomate por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1962-1966.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (2003) Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a Publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 jun. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 10 maio 2010.
- BALLESTEROS, O.; TORO I.; SANZ-NEBOT, V.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J.L.; BARBOSA, J. (2003) Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 798, n. 1, p. 137-144.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.L. (2006) *Fundamentos da Cromatografia*. Campinas: Editora da Unicamp. 452 p.
- DE SMET, J.; BOUSSERY, K.; COLPAERT, K.; DE SUTTER, P.; DE PAEPE, P.; DECRUYENAERE, J. *et al.* (2009) Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: a bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 10, p. 961-967.
- DORNE, J.L.; SKINNER, L.; FRAMPTON, G.K.; SPURGEON, D.J.; RAGAS, A.M. (2007) Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1259-1268.
- ECOSANRES. (2008) *Guidelines on the Use of Urine and Faeces in Crop Production*. Disponível em: <http://www.ecosanres.org/pdf_files/ESR-factsheet-06.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.
- ESPINOSA-MANSILLA, A.; de la PEÑA, A.M.; GÓMEZ, D.G.; LÓPEZ, F.S. (2006) Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. *Talanta*, v. 68, n. 4, p. 1215-1221.
- GIL, E.S. (2009) *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks.
- GOLET, E.M.; ALDER, A.C.; HARTMANN, A.; TERNES, T.A.; GIGER, W. (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 15, p. 3632-3638.
- GONZÁLEZ, C.; MORENO, L.; SMALL, J.; JONES, D.G.; SÁNCHEZ BRUNI, S.F. (2006) A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. *Analytical Chimica Acta*, v. 560, n. 1-2, p. 227-234.
- GOYAL, R.N.; RANA, A.R.; CHASTA, H. (2012) Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, v. 83, p. 46-51.
- GULYAS, H.; GAJUREL, D.R.; KUCHARÉK, K.; SKWIOT, R.; WINKER, M.; FURMANSKA, M.; OTTERPOHL R. (2007) Elimination of human pharmaceuticals by yellow water ozonation. In: *Conferência Internacional de Saneamento Sustentável: "Food and Water Security for Latin America"*, 1 Resumos... Fortaleza: ECOSANLAC. v. 1, p. 186-187.
- INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. (2011) *Orientação sobre validação de métodos analíticos*: DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro: INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2011.
- KROL, G.J.; BECK, G.W.; BENHAM, T. (1995) HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, n. 1-2, p. 181-190.
- LIANG, H.; KAYS, M.B.; SOWINSKI, K.M. (2002) Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 772, n. 1, p. 53-63.
- MARAZUELA, M.D. & MORENO-BONDI, M.C. (2004) Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1034, n. 1-2, p. 25-32.
- MASCHER, H.J. & KIKUTA, C. (1998) Determination of norfloxacin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 812, n. 1-2, p. 381-385.
- MIRANDA, J.A. (2001) *Caracterização Fotofísica de Derivados de Cumarinas*. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. (2000) *Overcoming antimicrobial resistance: report on infectious diseases 2000*. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/66672>>. Acesso em: 18 out. 2011.

- PENA, A.; PINA, J.; SILVA, L.J.; MEISEL, L.; LINO, C.M. (2010) Fluoroquinolone antibiotics determination in piggeries environmental waters. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 12, n. 3, p. 642-646.
- PEREIRA, A.M.P.T. (2009) *Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde humana*. 129 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.
- PICÓ, Y. & ANDREU, V. (2007) Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1287-1299.
- POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S. (2001) Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. *Journal of Chromatography A*, v. 914, n. 1-2, p. 89-94.
- PRONK, W.; BIEBOW, M.; BOLLER, M. (2006) Treatment of source-separated urine by a combination of bipolar electro dialysis and a gas transfer membrane. *Water Science and Technology*, v. 53, n. 3, p. 139-146.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. (2001) Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 68-76.
- RAMOS PAYÁN, M.; BELLO LÓPEZ, M.Á.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; GONZÁLEZ, J.A.; CALLEJÓN MOCHÓN, M. (2011) Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, n. 2, p. 332-341.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780.
- SANTOS, L.H.; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M.C. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 175, n. 1-3, p. 45-95.
- SCHNEIDER, M.J. & DONOGHUE, D.J. (2002) Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 780, n. 1, p. 83-92.
- SEIFRTOVÁ, M.; NOVÁKOVÁ, L.; LINO, C.M.; PENA, A.; SOLICH, P. (2009) An overview of analytical methodologies for determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 649, n. 2, p. 158-179.
- SEIFRTOVÁ, M.; PENA, A.; LINO, C.M.; SOLICH, P. (2008) Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 3, p. 799-805.
- SOUSA, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; PENA, A.; LINO, C.; FALCÃO, A. (2010) Development and validation of a fast isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of norfloxacin, lomefloxacin and ciprofloxacin in human plasma. *Biomedical Chromatography*, v. 25, n. 5, p. 535-541.
- SOUSA, J.C. (2005) *Manual de antibióticos antibacterianos*. 2. ed. Porto: Universidade Fernando Pessoa.
- TETTENBORN, F.; BEHRENDT, J.; OTTERPOHL, R. (2007) *Resource recovery and removal of pharmaceutical residues: treatment of separate collected urine*. Instituto e Gestão de Águas Residuárias e Proteção da Água, Universidade de Tecnologia de Hamburg, Harburg, 119 p.
- VAZQUEZ-ROIG, P.; ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. (2010) SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (Valência, Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 7, p. 2851-2864.
- VYBÍRALOVÁ, Z.; NOBILIS, M.; ZOULOVA, J.; KVETINA, J.; PETR, P. (2005) High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, n. 5, p. 851-858.
- ZHANG, J.; LI, Z.; GE, G.; SUN, W.; LIANG, Y.; WU, L. (2009) Impacts of soil organic matter, pH and exogenous copper on sorption behavior of norfloxacin in three soils. *Journal of Environmental Sciences (China)*, v. 21, n. 5, p. 632-640.
- ZHAO, S.J.; JIANG, H.Y.; DING, S.Y.; LI, X.L.; WANG, G.Q.; LI, C. *et al.* (2007) A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro)quinolone residues in chicken muscle. *Chromatographia*, v. 65, n. 9-10, p. 539-544.