

FLUORIMETRIA NA ANÁLISE FARMACÊUTICA: UMA REVISÃO

FLUORIMETRY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS: A REVIEW

Diego Ives de Vilasboas e Santos^{1,2*}, Eric de Souza Gil^{1,3}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. Praça Universitária s/n. 74605-220, Goiânia – GO, Brasil.

²Graduando do curso de Farmácia FF/UFG.

³Professor de Análise Farmacêutica e Controle de Qualidade Físico-Químico de Medicamentos FF/UFG; Orientador.

*Autor para correspondência e-mail: diegoives@yahoo.com.br

Recebido em 12/06/2009 - Aceito em 02/03/2010

RESUMO: A fluorimetria é um método de análise usado na determinação quantitativa ou qualitativa de substâncias que são capazes de emitir fluorescência. Sendo assim, pode ser muito útil na análise farmacêutica, para doseamento de fármacos em formulações farmacêuticas, identificação de impurezas, estudos de interações ligante-receptor, e até mesmo quantificação. Aparelhos usados em fluorimetria podem ser usados também como sistemas de detecção em outros métodos, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa. Sendo assim, este artigo de revisão traz várias aplicações possíveis para a fluorimetria dentro da análise farmacêutica, com trabalhos que relatam o uso da fluorimetria na análise de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: *fluorimetria, análise farmacêutica, identificação, quantificação.*

ABSTRACT: Fluorimetric method of analysis is used in qualitative or quantitative determination of substances which are capable of delivering fluorescence. Thus, it can be very useful in pharmaceutical analysis for determination of drugs in pharmaceutical formulations, identification of impurities, studies of ligand-receptor interactions, and even quantification. Equipment used in fluorimetry can be used as detection systems in other methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. Therefore, this review brings several possible applications for fluorimetry in pharmaceutical analysis, with works that report the use of the fluorimetric analysis of drugs.

KEYWORDS: *fluorimetry, pharmaceutical analysis, identification, quantification.*

INTRODUÇÃO

A fluorimetria consiste na técnica utilizada na determinação qualitativa ou quantitativa de substâncias nas quais ocorre o fenômeno da fluorescência, que, segundo Mendham *et. al.* (2002), é resultado da absorção de energia radiante e da posterior emissão de parte dessa energia.

A fluorescência, assim como a fosforescência, fenômeno similar, são casos distintos de um fenômeno que recebe a denominação generalista de fotoluminescência. A diferença entre estes dois fenômenos, segundo Skoog *et. al.* (2002), é que na fluorescência, o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ($<10^{-5}$ s, podendo ser de até 10^{-12} s), enquanto na fosforescência, esse intervalo de tempo é maior, podendo ser de alguns segundos ou até mais. Este retardo no tempo da emissão de

energia ocorre porque a molécula entrou num estado de energia chamado estado excitado tripleto, caracterizado por um desemparelhamento nos orbitais eletrônicos, ou seja, os spins dos elétrons passaram a estar paralelos. Na fluorescência, a energia é emitida mais rapidamente pelo fato de a molécula estar num estado chamado estado excitado singleto, no qual os orbitais eletrônicos estão emparelhados, e os spins dos elétrons, conseqüentemente, em direções opostas. A fluorescência ocorre com a liberação de energia que faz com que a molécula sofra uma transição do estado excitado singleto para o estado fundamental singleto, no qual a molécula se encontrava antes da absorção da energia que a excitou.

O fenômeno da emissão de fluorescência pode ser melhor compreendido com a visualização do esquema abaixo:

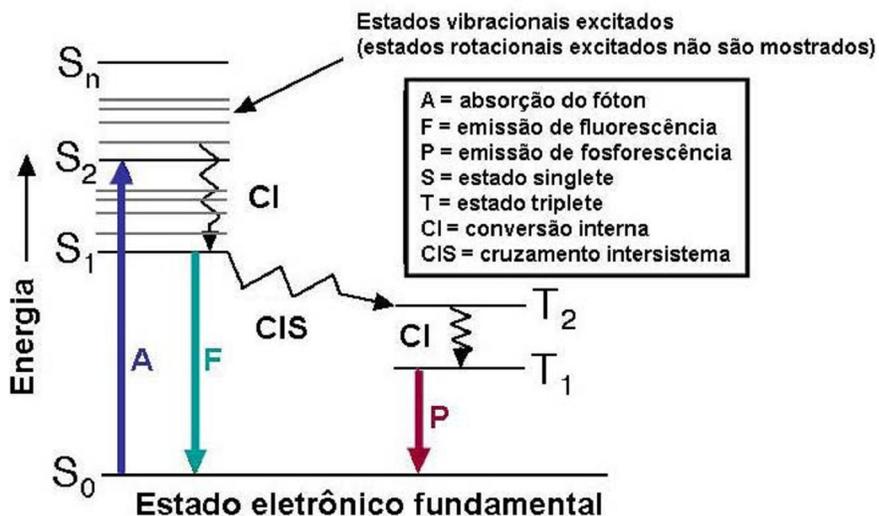


Figura 1. Diagrama de Jablonski

Fonte: Silva, 2007.

Segundo Gil (2005), a fluorimetria tem como vantagens a elevada sensibilidade (cerca de 100 vezes maior do que a da espectroscopia UV-visível), e a maior seletividade, já que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência. Em contrapartida, tem como desvantagem o fato de que o campo de aplicação se limitaria apenas a moléculas capazes de emitir fluorescência ou fosforescência. Fato este, que pode ser parcialmente contornado por outras técnicas que envolvem luminescência, como a quimiluminescência molecular, na qual a fonte de energia para a excitação das moléculas do analito é uma reação química, e não a absorção de fótons, como na fotoluminescência. Ressalta-se que nestes casos, pode não haver envolvimento direto do analito na medida, mas sim envolver a luminescência do produto da reação ou mesmo a inibição que o analito causa na luminescência de um determinado reagente (Skoog *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2005).

A procura por métodos analíticos mais sensíveis tem impulsionado o desenvolvimento dos métodos fluorimétricos, sendo que a determinação da fluoresceína a nível de femtomoles ($LD = 0,6 \times 10^{-15} \text{ molL}^{-1}$) é possível pelo uso da fluorimetria (Liu & Huang, 2006).

Dependendo, da técnica aplicada, pode-se em alguns casos até triplicar a fluorescência do analito, elevando assim a sensibilidade do método. Como exemplos podemos destacar desde o simples uso de tensoativos (Cruces Blanco *et al.*, 1995), até reações químicas complexas de derivação gerando espécies fluorescentes (Sharma & Schulman, 1999). O emprego de tensoativos na determinação

fluorimétrica do ácido fólico em preparações farmacêuticas, foi utilizado para aumentar a intensidade da fluorescência emitida (Cruces Blanco *et al.*, 1995).

Outra estratégia comumente empregada no desenvolvimento de métodos fluorimétricos envolve a supressão da fluorescência de substâncias altamente fluorescentes, como íons fluoreto, fosfato, cianeto e sulfato pelo analito alvo (Sharma & Schulman, 1999).

Ressalta-se ainda que o emprego da Fluorimetria em análise farmacêutica não se limita a ensaios de identificação ou potência, mas também a outras funções. Entre estas destaca-se os estudos de estabilidade. Assim, a forte influência da luz sobre propriedades fluorimétricas da norfloxacin foi utilizada em estudos de fotodegradação (Córdoba-Díaz *et al.*, 1998).

Estas e outras possíveis aplicações da fluorimetria no controle de qualidade de insumos farmacêuticos, desenvolvimento de sistemas de detecção, bem como em outras funções da análise farmacêutica são compiladas neste trabalho.

FLUORIMETRIA APLICADA À ANÁLISE QUANTITATIVA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS

Vários métodos analíticos desenvolvidos para quantificação de fármacos em preparações farmacêuticas estudos evidenciam a sensibilidade dos métodos fluorimétricos e, conseqüentemente, a sua aplicabilidade para análise farmacêutica e clínica. Ressaltam-se aqui algumas das estratégias empregadas no sentido de aumentar a sensibilidade, seletividade e campo de aplicação.

O uso de complexos de inclusão de fármacos e ciclodextrinas, também tem sido explorado no desenvolvimento de métodos fluorimétricos. A inclusão de cetoconazol em β -ciclodextrina resulta em aumento da fluorescência nativa da droga, sendo que em condições otimizadas, o método desenvolvido responde linearmente na faixa de 0,01 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Outrossim, aspectos estéricos e eletrônicos inerentes a cavidade de diferentes ciclodextrinas podem ser explorados em prol da seletividade (Jalali & Afshoon, 2008).

O tensoativo dodecilsulfato de sódio associado ao uso da β -ciclodextrina, foram empregados para aumentar a intensidade da fluorescência do cloridrato de verapamil. O método fluorimétrico assim desenvolvido, foi utilizado para determinações do fármaco em comprimidos. Foi encontrado um pico de emissão num comprimento de onda de 318 nm, depois de uma excitação a 231nm. O espectro ficou retilíneo em faixas de concentração entre 0,02-0,2 e 0,02-0,25 $\mu\text{g/ml}$, com o uso do dodecilsulfato de sódio e da β -ciclodextrina, respectivamente (Walash *et. al.*, 2006).

Por sua vez, vários são os trabalhos descritos em que se utilizou a derivatização química.

A determinação fluorimétrica do diclofenaco sódico, através de um método indireto envolveu a derivatização química do fármaco resultando em produto fluorescente. A detecção deste produto resultante permitiu a quantificação do fármaco em amostras de comprimidos, sendo que os resultados assim obtidos concordaram com outras metodologias descritas na literatura (Castillo & Bruzzone, 2006).

A cinarizina e a domperidona foram determinadas simultaneamente em preparações farmacêuticas por fluorimetria após tratamento da amostra por derivatização química. O método foi considerado bastante sensível, assim pode também ser utilizado em amostras de interesse clínico (Walash *et. al.*, 2008).

A derivatização da oxamniquina com cloreto de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonil, em presença de carbonato de sódio 0,5 mol/L pH 10, resultou em produto de alta fluorescência. Por sua vez, a determinação deste produto permitiu a determinação do fármaco em preparações farmacêuticas na faixa de concentração linear de 0,02 e 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (El-Enany *et. al.*, 2008).

A cefalexina após pré-tratamento por derivatização química com 2-cianoacetamida em presença de amônia a 33% resultou em um produto fluorescente à 339 nm, possibilitando a determinação quantitativa do fármaco a 439 nm (El-Wasseef, 2007).

A derivatização da efedrina com 7-cloro-4-nitrobenzofurazano, em pH 9 também resultou em composto fluorescente, cuja determinação foi possível na faixa linear de concentração entre 20-25000ng/ml (Ulu *et. al.*, 2006).

Já a determinação fluorimétrica do ciclofenil em formulações farmacêuticas comerciais, envolveu a derivatização por tratamento fotoquímico do analito, apresentando excelentes resultados (Pacheco *et. al.*, 2008).

Outro exemplo, inclui a validação de um método fluorimétrico para análise de comprimidos de reboxetina, uma droga antidepressiva, comparando o método com outros disponíveis na literatura. Neste método,

foi aplicada a derivatização com a substância 7-cloro-4-nitrobenzofurazano (Onal, 2006).

Em todas as reações de derivatização, são ressaltadas a importância do pH tanto para eficiência destas reações, como também para equilíbrio da forma de máxima fluorescência (Razek *et.al.*, 2008).

Foi feita também a determinação por fluorimetria o anti-histamínico desloratadina.

O método fluorimétrico apresentou menores limites de detecção e de quantificação que outras metodologias aplicadas, *i.e.* HPLC e espectrometria, confirmando a destacada sensibilidade do método (El-Enany *et. al.*,2007).

A Tabela 1,apresenta alguns métodos recentemente desenvolvidos para vários fármacos, ressaltando a sensibilidade dos métodos fluorimétricos.

Tabela 1. Limites de detecção e quantificação de métodos fluorimétricos na análise de fármacos.

Fármaco	LD*	LQ**	Referência
Gatifoxacina	3,97 ng/mL		Razek <i>et al</i> , 2008
	3,36 ng/mL		Zu, Gong & Yu, 2008
Oxamniquina	0,007 µg/ml	0,02 µg/ml	El-Enany, Belal & Rizk, 2008
Piroxicam	0,006mg/L		Tabrizi, 2007
Propranolol	0,008mg/L		
Cefalexina	7,76ng/mL		El-Wasseef, 2007
Efedrina	7,3ng/mL		Ulu, 2006
Cinarizina		0,058 µg/ml	Walash <i>et. al.</i> , 2008
Domperidona		0,02 µg/ml	
Cloridrato de verapamil + dodecilsulfato de sódio	5,58x10 ⁻³ µg/ml		Walash <i>et. al.</i> , 2006
Macrolídeos (azitromicina diidratada, claritromicina, roxitromicina e etilsuccinato de eritromicina)	0,74-1,20 ng/mL	2,47-4,02ng/mL	El-Rabbat <i>et. al.</i> , 2006

*LD: limite de detecção

**LQ: limite de quantificação

Kubota *et. al.* (2007) desenvolveram método fluorimétrico para análise quantitativa

do paracetamol, em comprimidos. A máxima excitação e a máxima emissão ocorreram,

respectivamente, nos comprimentos de onda de 333 e 382 nm.

Kubota *et. al.* (2005) fizeram uma determinação fluorimétrica de ácido acetilsalicílico em matrizes sólidas. O fármaco foi detectado em amostras contendo excipientes como lactose, amido, talco e estearato de magnésio. Foram obtidos espectros de excitação e emissão com concentrações entre 50 e 170 mg/g da droga, a uma temperatura de 25 ± 5°C, e comprimentos de onda entre 250 e 310nm (para picos de excitação) e entre 300 e 450 (para picos de emissão). O método da fluorimetria foi também validado para a detecção de 4-aminofenol em comprimidos de paracetamol, sendo avaliado em aspectos como linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, sendo considerado aceitável para fazer este tipo de análise (Dejaegher *et. al.*, 2008).

A possibilidade do uso da fluorimetria no controle de qualidade de medicamentos também é reiterada no estudo no qual fizeram a determinação do albendazol em comprimidos. Não foram encontradas diferenças entre o método fluorimétrico e o método de referência presente na farmacopéia norte-americana (USP), com limite de confiança de 95%. Os autores indicam a fluorimetria como um método que pode ser usado em análises de rotina, para controle de qualidade do albendazol (Kuecuekkolbasi *et. al.*, 2008).

A seletividade dos métodos fluorimétricos também merece destaque e pode permitir em muitos casos determinações simultâneas de 2 ou mais fármacos em medicamentos compostos. Assim, foi proposto um método fluorimétrico para determinação

de piroxicam e propranolol em preparações farmacêuticas, que não só permitiu a determinação em baixíssimos limites de detecção (Tabela 1), como também conferiu seletividade para determinação simultânea. (Tabrizi, 2007).

Outros trabalhos que propõe o uso de métodos fluorimétricos para determinação simultânea de 2 ou mais fármacos incluem:

a) Determinações de misturas ternárias de fármacos, como a de dexametasona, maleato de dexclorfeniramina e cloridrato de flufenazina, em misturas sintéticas e em formulações comerciais (El-Yazbi *et. al.*, 2006).

b) Análise de medicamentos contendo aciclovir e cloridrato de acebutolol (Ayad *et. al.*, 2007).

c) Determinação dos fármacos tramadol, acebutolol e dotiepina (Abdellatef *et. al.*, 2006).

d) Determinação de cloridrato de alfuzozina em presença de seus produtos de degradação de acordo com os parâmetros da "International Conference on Harmonization" (ICH)(Fayed *et. al.*, 2007).

FLUORIMETRIA APLICADA A SISTEMAS DE DETECÇÃO

Outra abordagem da fluorimetria em análise quantitativa envolve o desenvolvimento e emprego de sistemas de detecção em métodos de separação, os quais já são aplicados de forma ampla em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) e eletroforese capilar.

Deste modo, vários trabalhos tem sido propostos, para análise de medicamentos diversos, os quais incluem: antidepressivos (Patti *et. al.*, 2008); ginsenosídeos (Dihua *et.*

al., 2001) entre vários outros exemplos (de Vries *et. al.*, 2008; Sagirli & Ersoy, 2004; Schenkel *et. al.*, 2005; Othman *et. al.*, 2007; Pobozy *et. al.*, 2005).

O uso de sistemas de detecção por fluorimetria foram considerados bastante sensíveis em todos os trabalhos citados, sendo capazes de identificar facilmente o fármacos analisados e também seus metabólitos, em casos nos quais as amostras eram de sangue.

Há outros casos em que a fluorimetria é usada como sistema de detecção nesses métodos, como no caso do experimento que avaliou o plasma de ratos após a administração de mesilato de dihidroergotamina. Essa substância foi administrada por via nasal e posteriormente doseada por HPLC com sistema de detecção fluorimétrico (Chen *et. al.*, 2006).

FLUORIMETRIA APLICADA NO ESTUDO DAS INTERAÇÕES LIGANTE – RECEPTOR

Os ensaios fluorimétricos podem ter uma vasta aplicação para o estudo das interações ligante-receptor e, através disso, servir como

uma ferramenta para o *screening* de novos fármacos, como sugere o trabalho no qual foi determinada fluorimetricamente a atividade das enzimas quinase e ATPase. Esta técnica permitiria até um *screening* de moduladores para essas enzimas (Ostanin e Hunsacker, 2008).

Em outro trabalho, defendeu-se a teoria de que a fluorimetria em correlação com a espectroscopia pode ser utilizada para estudar detalhadamente as interações ligante-receptor, em cada um de seus domínios (Bridson & Hill, 2007).

Alguns fármacos ou classes terapêuticas em particular tiveram suas interações com receptores estudadas por métodos fluorimétricos. Exemplos disso são: o cloridrato de trazodona (Ni *et. al.*, 2007), um anti-depressivo que interage com a albumina sérica bovina; e um grupo de fármacos anti-câncer (Aaron & Trajkovska, 2006), cujas interações com biomoléculas como DNA e proteínas foram avaliadas, além de formações de complexos.

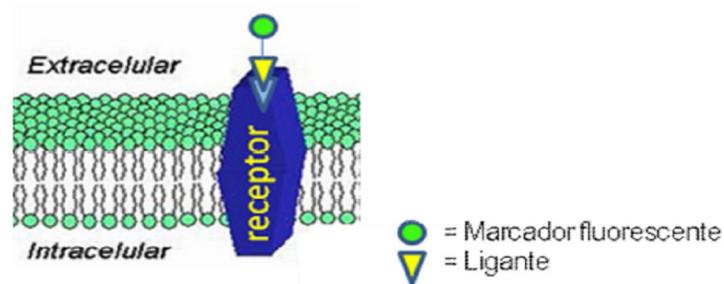


Figura 2. Interação ligante marcado – receptor.

As interações proteína-proteína também podem ser avaliadas por métodos fluorimétricos, como foi relatado num trabalho que defende a possibilidade do uso da fluorimetria para a busca de novas substâncias terapêuticas ativas e caracterizar novos receptores biológicos (Burgle *et. al.*, 2003).

A interação dos flavonóides quercetina, kampferida e luteolina com o DNA também foi investigada, utilizando-se acridina como um padrão de fluorescência. Esta acridina se liga ao DNA e permite essa avaliação, através da obtenção dos coeficientes de ligação dos flavonóides com o DNA (Bi *et. al.*, 2006).

E ainda, a fluorescência também tem se demonstrado importante no *screening* e em testes de fármacos, como foi feito com o anti-tumoral 6-tioguanina (Wang *et. al.*, 2006), analisando sua atividade e sua interação com o DNA, e com medicamentos anti-Leishmania, avaliando a suscetibilidade dos amastigotas aos fármacos com certa facilidade e confiabilidade (Le Pape *et. al.*, 2003).

FLUORIMETRIA APLICADA EM ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS

A fluorimetria também encontra aplicabilidade em estudos farmacocinéticos de certos fármacos, ou seja, através de amostras biológicas, é possível saber sobre aspectos do comportamento do fármaco no organismo, como taxas de absorção e eliminação do produto.

Para exemplificar isso, temos trabalhos como o da determinação de cloridrato de prenalterol, um medicamento usado como agente simpatomimético estimulante dos receptores beta-adrenérgicos, em amostras de

plasma e urina. O estudo teve resultados bastante satisfatórios (Aly, 1999) .

Outro exemplo de aplicação da fluorimetria nesse tipo de estudo é o trabalho no qual foi feito doseamento dos anti-inflamatórios ácido mefenâmico, ácido flufenâmico e ácido meclofenâmico em soro (Ruiz *et. al.*, 1998).

Também pode ser determinado em amostras de soro e urina o vasodilatador e estimulante de receptores beta adrenérgicos cloridrato de isoxsuprina, como mostra o trabalho que também obteve resultados bem semelhantes às metodologias oficiais (Alarfaj, 2002).

OUTRAS APLICAÇÕES DA FLUORIMETRIA

Além das aplicações mais comuns já citadas, a fluorimetria também é usada em processos como monitoramento de processos terapêuticos, tanto no que diz respeito à atividade do fármaco no organismo como aos efeitos causados.

Foram usados métodos fluorimétricos para determinar a quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, que podem ser aplicados em diagnósticos, testes de toxicidade de fármacos e em monitoramento terapêutico, adicionando fluoróforos a amostras de ácidos nucleicos (Sacko *et. al.*, 2008).

Outro trabalho avaliou a sensibilidade individual à quimioterapia para tratamento de tumores sólidos em humanos (Bogush *et. al.*, 2008), adicionando verapamil e genisteína, em diferentes concentrações, às amostras de células tumorais, e adicionando, depois, doxorubicina às amostras, e avaliando a variação da fluorescência emitida pela

doxorrubicina para interpretar os resultados e obter conclusões sobre essa sensibilidade.

Usou-se a fluorimetria como um dos métodos de detecção para monitoramento de farmacoterapia contra inflamação eosinofílica das vias respiratórias em gatos com asma experimentalmente induzida, sendo usados para este tratamento os anti-histamínicos ciproheptadina e cetirizina. Este estudo levou à conclusão de que não é recomendável indicar estes medicamentos como monoterapia para o tratamento de asma (Schooley *et. al.*, 2007).

Métodos espectrofluorimétricos também foram usados para efetuar testes da efetividade de nanopartículas como carreadores de fármacos, medindo através deste método o coeficiente de partição do pireno. Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a sensibilidade das nanopartículas a determinadas temperaturas (Zhang *et. al.*, 2007).

A espectroscopia de fluorescência também pode ser usada para detecção de tumores (Borisova *et. al.*, 2007) através da administração de ácido delta-amino-levulínico, que é fluorescente e serve como um marcador. O método desenvolvido neste trabalho detectou casos de tumores de esôfago e estômago. Apesar de algumas dificuldade terem sido encontradas para a interpretação dos dados, como a autofluorescência apresentada pelo tecido avaliado, a presença de fluoróforos exógenos e a reabsorção da luz emitida, por alguns cromóforos encontrados no tecido, foi possível obter uma boa correlação entre o método espectrofluorimétrico desenvolvido e os

exames histológicos feitos com as amostras destes tecidos.

O uso de substâncias fluorescentes também foi usado para dar origem a aminopiridinas substituídas, que serviram como substrato para amido hidrolases (amilases), para a avaliação da atividade dessas enzimas através da variação da fluorescência dessas aminopiridinas substituídas (Hammock *et. al.*, 2008). Esse método serve como *screening* de métodos de diagnóstico e tratamento para distúrbios associados à atividade inadequada dessas enzimas.

Outro estudo de fármacos foi feito analisando-se a fotodegradação do ansiolítico alprazolam, e seus produtos de degradação (Nudelman & Gallardo Cabrera, 2002). O método fluorimétrico foi usado devido à sua capacidade de detectar os produtos de degradação do alprazolam em baixas concentrações. Esta análise foi feita com o fármaco acondicionado em diferentes níveis de pH, o que permitiu constatar que a fotossensibilidade do alprazolam aumenta com a diminuição do pH. Isso mostra que se deve ter um controle do pH durante o desenvolvimento dos processos de fabricação do medicamento.

CONCLUSÕES

Diante de tudo que foi exposto em trabalhos relatados nesta revisão, torna-se possível concluir que a fluorimetria é uma técnica bastante versátil e útil na análise farmacêutica, principalmente no controle de qualidade de fármacos e de formas farmacêuticas. Ressalta-se ainda que o fato de poucos fármacos serem fluorescentes, pode

ser perfeitamente contornado pela alternativa da derivatização, pois a geração de produtos fluorescentes em reações químicas ou a diminuição da fluorescência de substância altamente fluorescentes permitem a detecção e indireta até mesmo a quantificação destes analitos. Em contrapartida, a simplicidade destes métodos, os credenciam para o uso em rotinas de controle de qualidade de medicamentos na indústria farmacêutica, como também em amostras de interesse clínico, assim como para determinação de

atividade enzimática e de interações fármaco ligante.

Assim, os métodos baseados em fluorescência não se resumem apenas ao diagnóstico laboratorial e a espécies fluorescentes, podendo ser úteis também na análise farmacêutica quantitativa de fármacos em formulações farmacêuticas, matérias primas e amostras clínicas, na identificação e quantificação de produtos de degradação e impurezas, bem como em estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron, Jean-Jacques; Trajkovska, Snezana. Fluorescence studies of anti-cancer drugs - analytical and biomedical applications. *Current Drug Targets*, 2006; 7(9): 1067-1081.

Abdellatef HE, El-Henawee MM, El-Sayed HM, Ayad MM. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for analysis of tramadol, acebutolol, and dothiepin in pharmaceutical preparations. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006, 65A(5): 1087-1092.

Alarfaj NAA, Fluorimetric determination of isoxsuprine hydrochloride in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 28: 331–335.

Aly FA Fluorimetric determination of prenalterol hydrochloride in pharmaceuticals and biological fluids based on its oxidation reaction by hexacyanoferrate(III). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999, 21: 483–489.

Ayad MM, Abdellatef HE, El-Henawee MM, El-Sayed HM. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for analysis of acyclovir and acebutolol hydrochloride. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, 66A(1): 106-110.

Bi S, Qiao C, Song D, Tian Y, Gao D, Sun Y, Zhang H, Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe. *Sensors and Actuators B*. 2006, 119: 199–208.

Bogush TA, Ravcheeva AB, Konukhova AV, Smirnova GB, Bogush EA, Komov DV, Laktionov KK, Polotskii BE, Baryshnikov AY, Davydov MI. Method for determination of individual sensitivity to chemotherapy of human solid tumors. *Russ*. 2008, 21pp.

Borisova EG, Vladimirov BG, Angelov IG, Avramov LA. Fluorescence spectroscopy of gastrointestinal tumors using \square -ALA. *The International Society for Optical Engineering*. 2007, 6604(Laser Physics and Applications), 66042H/1-66042H/5.

Bridson SJ, Hill SJ. Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007, 28(12): 637-645.

Burgle M, Guthaus E, Schmitt M, Magdolen V, Kessler. Method for the determination of protein protein interactions by fluorescence measurement. *Ger. Offen*. 2003, 6 pp. CODEN: GWXXBX DE 10209030 A1 20030327

Castillo MA, Bruzzone L. Indirect fluorometric determination of diclofenac sodium. *Analytical Sciences*. 2006, 22(3): 431-433.

Chen J, Liu G, You Y, Lu Y, He H, Tang X. The pharmacokinetics and bioavailability of dihydroergotoxine mesylate after nasal administration to rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Hong Kong, China). 2006, 1(3-4): 229-235.

Córdoba-Díaz M, Córdoba-Borrego M, Córdoba-Díaz D. The effect of photodegradation on the fluorescent properties of norfloxacin (Photodegradation and fluorescence of norfloxacin). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998, 18: 865–870.

Cortes MJV. Avaliação espectral da fluorescência de cinco cerâmicas livres de metal. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR. 2004. 83p.

Cruces BC, Segura CA, Fernández GA, Román CA. Micellar-enhanced synchronous-derivative fluorescence determination of derivatized folic acid in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995, 13: 1019-1025.

De Vries NA, Ouwehand M, Buckle T, Beijnen JH, Van Tellingen O. Determination of topotecan in human and mouse plasma and in mouse tissue homogenates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2007, 21(11): 1191-1200.

Dejaegher B, Bloomfield MS, Smeyers-Verbeke J, Vander HY. Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations. *Talanta*, 2008, 75(1), 258-265.

Dihua SG, Han HW, Rui Z, Zhao YX, Xiong SX, Liu GQ. New method for high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection of ginsenosides. *Journal of Chromatography A*. 2001, 910: 367–372.

EI-Enany N, Belal F, Rizk M. Spectrofluorimetric Determination of Oxamniquine in Dosage Forms and Spiked Human Plasma through Derivatization with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride. *Journal of Fluorescence*. 2008, 18(2), 349-355.

EI-Enany N, El-Sherbiny D, Belal F. Spectrophotometric, spectrofluorometric and HPLC determination of desloratadine in dosage forms and human plasma. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2007, 55(12): p.1662-1670.

EI-Rabbat N, Askal HF, Khashaba PY, Attia NN. A validated spectrofluorometric assay for the determination of certain macrolide antibiotics in pharmaceutical formulations and spiked biological fluids. *Journal of AOAC International*. 2006, 89 (5): 1276-1287.

EI-Wasseef DR. Spectrofluorometric determination of cephalexin in pharmaceutical preparations and spiked human urine using 2-cyanoacetamide. *Spectroscopy Letters*. 2007, 40(6): 797-809.

EI-Yazbi FA, Hammud HH, Assi SA. New spectrofluorometric application for the determination of ternary mixtures of drugs. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 580(1): 39-46.

Fayed AS, Shehata MA, Hassan NY, Weshahy SA. Stability-indicating spectrophotometric and spectrofluorometric methods for determination of alfuzosin hydrochloride in the presence of its degradation products. *Pharmazie*. 2007, 62(11): 830-835.

Gil ES. *et. al.*, Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. São Paulo-SP, Pharmabooks, 2009.

Hammock BD, Huang HZ, Nishi K. Substituted aminopyridines as fluorescent reporters in highly sensitive fluorescent assays for amide hydrolases and screening and diagnostic applications. *PCT Int. Appl.* 2008, 57pp.

Jalali F, Afshoon A. Spectrofluorimetric study and detection of ketoconazole in the presence of α -cyclodextrin. *Journal of Fluorescence*. 2008, 18(1): 219-225.

Kai, Qin Y, Lin A, Hu X, Zou G. Interaction of daunomycin antibiotic with human serum albumin: Investigation by resonant mirror biosensor technique, fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, 39(3-4): 404-410.

Kubota LT, Moreira AB, Zagatto EAG, De Oliveira Neto G, Dias ILT. Determination of acetylsalicylic acid in solid matrix by fluorescence spectroscopy. *Braz. Pedido PI*. 2005, 12pp.

Kubota LT, Moreira AB, Zagatto EAG, De Oliveira Neto G, Dias ILT. Method for the direct determination of paracetamol in pulverized pharmaceutical samples using fluorescence spectroscopy. *Braz. Pedido PI* (2007)

Kuecuekkolbasi S, Guenduez B, Kilic E. Development of a Spectrofluorimetric Method for Determination of Albendazole in Tablets. *Analytical Letters*. 2008, 41(1): 104-118.

Le Pape P, Pagniez F, Abdala-Valencia H. A new fluorometric method for anti-Leishmania drug screening on axenic amastigotes. *Laboratoire de Acta Parasitologica*. 2003, 48(4): 301-305.

Liu Y, Li Y F, Huang CZ. Fluorimetric determination of fluorescein at the femtomole level with a self-ordered ring of a sessile droplet on glass slide support. *Journal of Analytical Chemistry*. 2006, 61(7): 647-653.

Matthew W, Hruska, Reginald FF. Simplified method for determination of rosiglitazone in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004, 803: 317–320.

Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. Vogel – Análise Química Quantitativa, Rio de Janeiro – RJ: LTC Editora, 2002.

Ni YN, Zhang X, Kokot S. Fluorometric Study of the Interaction between Trazodone Hydrochloride and Bovine Serum Albumin. *Analytical Letters*. 2007, 40(14): 2721-2736.

Nudelman NS, Gallardo Cabrera C. Spectrofluorimetric assay for the photodegradation products of alprazolam. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 30(3): 887-893.

Onal A. A highly sensitive spectrofluorometric method for the determination of a new antidepressant drug, reboxetine, in tablets. *Journal of AOAC International*. 2006, 89(4): 972-975.

Ostanin K, Hunsaker T. High-throughput fluorometric enzymic assay for determining kinase or ATPase activity, and drug screening applications. U.S. 2008, Patent Written in English. ACS on Scifinder.

Othman A, Lu J, Sunderland T, Cooper GJS. Development and validation of a rapid HPLC method for the simultaneous determination of triethylenetetramine and its two main metabolites in human

serum. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2007, 860(1): 42-48.

Pacheco WF, Batalha JAF, De Oliveira CC, Aucelio RQ. Fluorimetric determination of cyclofenil using photochemical derivatization. *Talanta*. 2008, 74(5): 1442-1449.

Patti A, Pedotti S, Sanfilippo C. Chiral HPLC analysis of milnacipran and its FMOC-derivative on cellulose-based stationary phases. *Chirality*. 2008, 20(2): 63-68.

Pobozy E, Michalski A, Sotowska-Brochocka J, Trojanowicz M. Determination of melatonin and its precursors and metabolites using capillary electrophoresis with UV and fluorometric detection. *Journal of Separation Science*. 2005, 28(16): 2165-2172.

Razek TMA, El-Baqary RI, Ramadan AE. Fluorimetric Determination of Gatifloxacin in Aqueous, Pure and Pharmaceutical Formulations. *Analytical Letters*. 2008, 41(3): 417-423.

Ruiz TP, Lozano CM, Tomás V, Carpena J. Analysis of binary mixtures of flufenamic, meclofenamic and mefenamic acids by derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Talanta*. 1998, 47: 537-545.

Sacko M, Delacotte N, Bah MS, Conti M. Method for assaying nucleic acids by fluorescence useful for quantifying cell death in diagnosis, cytotoxic drug testing and therapy monitoring. *PCT Int. Appl.* 2008, 52pp.

Sagirli O, Ersoy L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004, 809(1), 159-165.

Schenkel F, Rudaz S, Daali Y, Oestreich MK, Veuthey JL, Dayer P. Development and validation of a new reversed-phase ion pairing liquid chromatographic method with fluorescence detection for penciclovir analysis in plasma and aqueous humor. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005, 826(1-2): 1-7.

Schooley EK, Turner JBM, Jili RD, Spinka CM, Reinero CR. Effects of cyproheptadine and cetirizine on eosinophilic airway inflammation in cats with experimentally induced asthma. *American Journal of Veterinary Research*. 2007, 68(11): 1265-1271.

Sharma A, Schulman SG. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, New York: Wiley Interscience, 1999.

Bi SY, Qiao CY, Song DQ, Tian Y, Gao DJ, Sun Y, Zhang HQ. Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe. *Sensors and Actuators B*. 2006, 119: 199–208.

Silva KRB. Optodos para a determinação de SO₂ e O₂. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Departamento de Química. . 2007. 107p.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios de Análise Instrumental, Porto Alegre: Bookman Editora, 2002.

Tabrizi, A. B.. A simple spectrofluorimetric method for determination of piroxicam and propranolol in pharmaceutical preparations. *Yaowu Shipin Fenxi*. 2007, 15(3): 242-248.

Ulu ST. Highly sensitive spectrofluorimetric determination of ephedrine hydrochloride in pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International*. 2006, 89(5), 1263-1267.

Walash MI, Belal F, El-Enany N, Abdelal AA. Second-derivative synchronous fluorometric method for the simultaneous determination of cinnarizine and domperidone in pharmaceutical preparations. Application to biological fluids. *Journal of Fluorescence*. 2008, 18(1): 61-74.

Walash M, Belal F, El-Enany N, Abdelsalam A. Spectrofluorometric determination of verapamil hydrochloride in pharmaceutical preparations and human plasma using organized media: application to stability studies. *Journal of AOAC International*. 2006, 89(6): 1565-1572.

Wang W, Wang SF, Xie F. An electrochemical sensor of non-electroactive drug 6-thioguanine based on the dsDNA/AET/Au. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2006, B120(1): 238-244.

Zhang YW, Jiang M, Zhao JX, Chen DY. Thermo-sensitive core-shell nanoparticles as potential drug carrier. *European Polymer Journal*. 2007, 43(12): 4905-4915.

Zhu X, Gong A, Yu S. Fluorescence probe enhanced spectrofluorimetric method for the determination of gatifloxacin in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008, 69A(2): p.478-482

