



**Ministério da Educação**  
**Universidade Federal da Grande Dourados**  
**Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**Combinação de Processamentos Matemáticos em Dados  
Voltamétricos: Aplicação na Eletroanálise de Amostras  
Socioambientais e Determinação Simultânea de Antibióticos**

**Luiz Henrique de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. Magno A. G. Trindade

Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

Dourados – 2017



**Ministério da Educação**  
**Universidade Federal da Grande Dourados**  
**Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**Combinação de Processamentos Matemáticos em Dados  
Voltamétricos: Aplicação na Eletroanálise de Amostras  
Socioambientais e Determinação Simultânea de Antibióticos**

**Luiz Henrique de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Magno A. G. Trindade

Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

O48c Oliveira, Luiz Henrique De  
Combinação de Processamentos Matemáticos em Dados Voltamétricos: Aplicação na Eletroanálise de Amostras Socioambientais e Determinação Simultânea de Antibióticos / Luiz Henrique De Oliveira -- Dourados: UFGD, 2017.  
75f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Magno Aparecido Gonçalves Trindade  
Co-orientador: Lúcio Angnes

Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.  
Inclui bibliografia

1. Contaminação da água. 2. Contaminantes emergentes. 3. Aplicação ambiental. 4. Abordagens eletroanalíticas. 5. Processo matemático alternativo. I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



### Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Combinação de Processamentos Matemáticos em Dados Voltamétricos: Aplicação na Eletroanálise de Amostras Socioambientais e Determinação Simultânea de Antibióticos”, de autoria de Luiz Henrique de Oliveira, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade (Orientador-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Cauê Alves Martins  
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 28 de fevereiro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a Deus por tudo que conquistei.

Dedico este trabalho a minha mãe, Ana Maria Rosati de Oliveira, e meu pai, Jose Donizete de Oliveira, que sem seus ensinamentos apoio e confiança não teria chegado até aqui.

À namorada, Ana Caroline, pela paciência apoio nos momentos que mais precisei.

Dedico também aos amigos e familiares que sempre me apoiaram e me ajudaram ao longo desta caminhada.

Foque nos seus objetivos, no seu caminho, nos seus desejos, nas suas vitórias, mas principalmente nas suas derrotas, pois é através delas que você se motiva a continuar tentando, errando, crescendo, aprendendo.

Assim, procurar entender, procurar sonhar e imaginar a vida de outra maneira. Problemas vêm e vão, mas a maneira como você irá solucioná-los é o que conta e sempre você irá se lembrar de que foi forte e superou todos os obstáculos que foram postos para você.

(Luhana Baldan)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor e orientador Magno pelos ensinamentos durante estes anos.

Ao professor Lucio Angnes que me acolheu em SP.

Aos amigos que participaram de forma direta e indireta desta caminhada.

As instituições de financiamento Fundect e CNPq, em especial a instituição UFGD, pelas oportunidades concedidas.

À UFGD, pelas oportunidades concedidas, as quais foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$v$  = Velocidade de varredura

$\Delta E_s$  = Incremento de potencial

ANOVA = Análise de variância

BR = Tampão Britton-Robinson

BTBA = Brometo de tetrabutil amônio

Cen. = Centrifugação

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMC = Concentração micelar crítica

Conc. = Concentração

CTEA = Cloreto de tetraetil amônio

CV = Coeficiente de variação

DANO = Danofloxacina

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo

DSS = Dioctil sulfocinato de sódio

ECl = Eletrodo de carbono impresso

EI = Eletrodo impresso

$E_p$  = Potencial de pico

EP = Erro puro

$E_{sw}$  = Amplitude

$f$  = Frequência

FAj = Falta de ajuste

FQs = Fluoroquinolonas

GF = Grafeno

$I_p$  = Corrente de pico

LD = Limite de detecção



LEVO = Levofloxacina

LQ = Limite de quantificação

LSS = Lauril sulfato de sódio

MELL-SBD-AU = microextração líquido-líquido em solvente de baixa densidade

assistido por ultrassom

MQ = Média Quadrática

nd = Não detectado

NFC = Nanofibra de carbono

NOR = Norfloxacin

NTC = Nanotubos de carbono

OQ = Onda quadrada

PD = Pulso diferencial

R = Regressão

r = Resíduo

TX-100 = Triton X-100

Ult. = Ultrassonificação;

UV = Ultravioleta

VC = Voltametria cíclica

VL = Varredura linear

VOQ = Voltametria de onda quadrada

Vor. = Vortex

VPD = Voltametria de pulso diferencial

VVL = Voltametria de varredura linear

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Técnicas analíticas, recomendadas pelas principais Farmacopeias, utilizadas como referência para determinação de FQs.....	<b>19</b>
<b>Tabela 2.</b> Condições experimentais e instrumentais utilizados e otimizados para técnica de VPD.....	<b>38</b>
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros experimentais e instrumentais estudados e otimizados para detecção simultânea das FQs.....	<b>50</b>
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros inerentes a curva de calibração, das três FQs.....	<b>52</b>
<b>Tabela 5.</b> Otimização quimiométrica do planejamento fatorial $2^3$ aplicado para o MELL-SBD-AU.....	<b>58</b>
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros estudados na etapa de otimização do procedimento de LDS-UA-LLME, juntamente com as condições otimizadas.....	<b>60</b>
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros e valores aplicados para a obtenção da matriz Doehlert.....	<b>60</b>
<b>Tabela 8.</b> Informações sobre o processamento de análise de variância (ANOVA) avaliada para verificar a importância do modelo de regressão quadrática.....	<b>61</b>
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtido para adição e recuperação das FQs, LEVO, NOR e DANO em amostras de água da torneira.....	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido nalidíxico. R<sub>1</sub>: substituintes do anel quinolônico..... **17**
- Figura 2.** Ilustração da matriz Doehlert com duas variáveis..... **24**
- Figura 3.** Estrutura básica das FQs e o mecanismo de eletro-oxidação..... **32**
- Figura 4.** Esquema geral para a oxidação das FQs LEVO <sup>[83]</sup> (A), NOR <sup>[84]</sup> (B), e DANO <sup>[85]</sup> (C)..... **33**
- Figure 5.** Voltamogramas de: PD (—), VL (— · —) e OQ (---), registrado sobre a superfície de EI-NFC, para oxidação de LEVO, NOR e DANO (18 μmol L<sup>-1</sup>). Condições experimentais: Tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). Parâmetros: VPD: Intervalo de potencial (ΔE<sub>s</sub>) = 10 mV, υ = 10 mV s<sup>-1</sup>, Amplitude (E<sub>sw</sub>) = 25 mV, tempo de pulso = 10 ms. VVL: velocidade de varredura (υ) = 100 mV s<sup>-1</sup>. VOQ: frequência (f) = 25 Hz, E<sub>sw</sub> = 20 mV, ΔE<sub>s</sub> = 5 mV..... **34**
- Figura 6.** Esquema ilustrativos para os potenciais de oxidação das FQs, LEVO (---), NOR (----) e DANO (—). Condições experimentais e instrumentais, realizado com a técnica de VPD, apresentadas na Figura 5..... **35**
- Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial registados para eletro-oxidação de 18 μmol L<sup>-1</sup>, individual de LEVO (----), NOR (- · -) e DANO (---) e simultâneo (—), sobre a superfície de EI-NFC. Condições experimentais: tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). Parâmetros da DPV: ΔE<sub>s</sub> = 4,0 mV, E<sub>sw</sub> = 30 mV e υ = 10 mV..... **36**
- Figura 8.** Voltamogramas de PD registados para LEVO, NOR e DANO (18 μmol L<sup>-1</sup>) sobre a superfície de (a —) EI-C (b —) EI-NT (c —) EI-GF e (d —) EI-NFC. Parâmetros: tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), ΔE<sub>s</sub> = 4,0 mV, E<sub>sw</sub> = 30 mV e υ = 10 mV s<sup>-1</sup>..... **37**
- Figura 9.** Influência do pH em função da corrente de pico (I) e do potencial de pico (II). Registrado para eletro-oxidação das FQs LEVO, NOR e DANO (18 μmol L<sup>-1</sup>), sobre a superfície de EI-NFC em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). Parâmetros da VPD: ΔE<sub>s</sub> = 4,0 mV, E<sub>sw</sub> = 30 mV e υ = 10 mV s<sup>-1</sup>. **40**
- Figura 10.** Voltamogramas de PD, registados na presença dos surfactantes, concentração de 100 μmol L<sup>-1</sup>: LSS (—), DSS (—) e na ausência de surfactante (—). Condições: oxidação eletroquímica de LEVO, NOR e DANO 1,85×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), ΔE<sub>s</sub> = 4,0 mV, E<sub>sw</sub> = 30 mV e υ = 10 mV s<sup>-1</sup>. Inserido: Estrutura química dos surfactantes aniônicos: LSS (—), DSS (—). **42**

<b>Figura 11.</b> Voltamogramas de PD registrados na presença dos surfactantes, concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ : CTEA (—), BTBA (—) e na ausência de surfactante (—). Condições: oxidação eletroquímica de LEVO, NOR e DANO $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ , $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inserido: Estrutura química dos surfactantes catiônicos: CTEA (—), BTBA (—).....	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> Voltamogramas de PD, registrados na presença do surfactante TX-100 (—), concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e na ausência de surfactante (—). Condições: eletro-oxidação simultânea de 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LEVO, NOR e DANO no EI-NFC, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ , $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inserido: Estrutura química do surfactante TX-100.....	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Voltamogramas de PD, com a aplicação da segunda derivada com a linha base corrigida, no estudo da concentração do surfactante TX-100 entre a concentração de 50 a 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para eletro-oxidação de LEVO, NOR e DANO em 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sobre a superfície do EI-NF, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ , $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b> Voltamogramas de PD: Original (I) e com a linha base corrigido (II) para a eletro-oxidação de 18,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ LEVO, NOR e DANO sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.....	<b>45</b>
<b>Figura 15.</b> Voltamogramas de PD, original com a linha base corrigida (—), submetido ao processo matemático de deconvolução, sinal referente a eletro-oxidação LEVO (—), NOR (—) e DANO (—), em de 18,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.....	<b>46</b>
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas de PD, com a aplicação: (I) de apenas a correção da linha base, (—) correção da linha base juntamente com primeira derivada (—), (II) apenas a correção da linha base (—) e correção da linha base juntamente segunda derivada (—). Condições: 18,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ das FQs LEVO, NOR e DANO, sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.....	<b>47</b>

<b>Figure 17.</b> Voltamogramas de PD após a aplicação da segunda derivada: (I) mostrado as correções de linha base (a) no início do pico, (b) do início ao final do pico, e (c) e no final do pico. (II) Aplicação do método de correção de linha base do início ao final do pico e correção da linha. Para as FQs LEVO, NOR e DANO em $18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TX-100. Parâmetros da VPD: expressos na Tabela 2.....	<b>48</b>
<b>Figura 18.</b> (I) Voltamogramas de PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação simultânea de LEVO, NOR e DANO, na faixa de concentrações de $4,8$ a $31 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sobre a superfície do EI-CNF. Inserção: (II) Curva de calibração, dependência da corrente de pico na concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 3.....	<b>51</b>
<b>Figura 19.</b> (I) Voltamogramas de DP, (II) inserção dos voltamogramas derivados com a linha base corrigida: (A) Branco em solução de tampão BR preparadas em amostra de água da torneira na ausência das FQs, (B) detecção direta em amostra de água da torneira sem qualquer etapa de pré-concentração, (C) detecção utilizando a pré-concentração eletroquímica em $0,4 \text{ V}$ a $400 \text{ s}$ e (D) pré-concentração via MELL-SBD-AU. B, C e D registrado para eletro-oxidação de LEVO, NOR e DANO em concentração de $8,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Utilizando as condições experimentais e instrumentais da Tabela 3.....	<b>54</b>
<b>Figura 20.</b> Valores de recuperações das FQs, em amostras de água da torneira, obtido variando a força iônica (variação de NaCl) e a fase extratora (acetona), para o procedimento de MELL-SBD-AU. Condições: instrumentais e experimentais, volume da amostra = $12 \text{ mL}$ , pH da amostra = $10$ , tempo de agitação via vortex = $15 \text{ min}$ , tempo ultrassonificação = $5 \text{ min}$ e tempo de centrifugação = $5 \text{ min}$ , condições apresentadas na Tabela 4.....	<b>56</b>
<b>Figura 21.</b> Diagrama de Pareto obtido para o planejamento fatorial $2^3$ , (A) LEVO, (B) NOR e (C) DANO. Vor. = vortex; Cen. = centrifugação; Ult. = Ultrassonificação.....	<b>59</b>
<b>Figura 22.</b> Superfície de resposta para LEVO (A), NOR (B) e DANO (C).....	<b>61</b>
<b>Figura 23.</b> (I) voltamogramas de PD, com aplicação da segunda derivada com a linha base corrigida para: (a (—)) $30 \mu\text{L}$ de amostra de água contendo $30, 26$ e $29 \mu\text{g L}^{-1}$ de LEVO, NOR e DANO, (b-d (—)) adições sucessivas de $30 \mu\text{L}$ de FQs ( $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). (II) Curva de adição do padrão. Condição: experimental e instrumental, otimizadas apresentadas nas Tabelas 3 e 8. ....	<b>62</b>

## LISTA DE FORMULAS

$\text{Efeito médio} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$	Equação 1 ..... <b>23</b>
$\text{Efeito} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i(+)-\sum_{i=1}^n y_i(-)}{n/2}$	Equação 2 ..... <b>23</b>
$\text{FE} = \frac{C_{\text{obt}}}{C_o}$	Equação 3 ..... <b>30</b>
$\text{Limite de detecção} = 3 \times \frac{SD}{b}$	Equação 4 ..... <b>51</b>
$\text{Limite de quantificação} = 10 \times \frac{SD}{b}$	Equação 5 ..... <b>51</b>

## RESUMO

Neste estudo, é apresentado um método eletroanalítico alternativo para determinação simultânea de três fluoroquinolonas em amostras de água da torneira. O procedimento consiste na combinação da microextração líquido-líquido (MELL) assistida por ultrassom utilizando solvente de baixa densidade e o procedimento matemático de segunda derivada. O procedimento de preparo da amostra via MELL possibilitou extrair e isolar seletivamente as fluoroquinolonas (FQs) levofloxacina (LEVO), norfloxacin (NOR) e danofloxacina (DANO) como também pré-concentrar com alto fator de enriquecimento (80 vezes). Após a extração, os resíduos contendo os analitos foram redissolvidos no eletrólito suporte e, porções contendo microgotas, foram detectadas diretamente (droplet-based) sobre a superfície do eletrodo impresso de nanofibra de carbono. O processo matemático foi realizado com correção da linha base antes e após a aplicação da segunda derivada dos sinais voltamétricos, possibilitando a separação dos picos parcialmente sobrepostos e a detecção simultânea. Por fim, a combinação dos procedimentos, de microextração e processamento matemático permitiu, ainda, que a metodologia fosse aplicada para análise de água da torneira e determinar simultaneamente as três FQs em níveis de traços e com alto fator de recuperação (valores próximos de 100%).

**Palavras chave:** Contaminação da água, Contaminantes emergentes, Aplicação ambiental, Abordagens eletroanalíticas, Processo matemático alternativo.

## ABSTRACT

In this study, is presented an alternative electroanalytical method for the simultaneous determination of three fluoroquinolones in tap water samples. The procedure consists in the combination of low-density solvent liquid-liquid microextraction (MELL) assisted by ultrasound and the mathematical procedure based on second derivative. The procedure for the sample preparation via MELL allowed to extract and isolate selectively the fluoroquinolones (FQs), levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) and danofloxacin (DANO) as well as preconcentrate with a high enrichment factor (about 80 times). After extraction, the residues containing the analytes were redissolved in the electrolyte support and, portions containing microdrops, were detected directly (droplet-based) on the surface of the carbon nanofiber-modified screen-printed electrodes. The mathematical process was performed with correction of the baseline before and after the application of the second derivative of the voltammetric signals, allowing the separation of partially overlapping peaks and simultaneous detection. Finally, the combination of microextraction procedure and mathematical processing allowed application of target methodology for analysis of tap water samples to simultaneously determine the three FQs at trace levels and with a high recovery factor (values close to 100%).

**Keywords:** Water contamination, Emerging contaminants, Environment application, Electroanalytical approaches, Alternative mathematical processing.



## SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO .....	13
1.1	Antibióticos .....	13
1.2	Fluoroquinolonas .....	14
1.2	Efeitos colaterais .....	15
1.4	Farmacopeias.....	16
1.5	Métodos Alternativos .....	16
1.6	Métodos Voltamétricos .....	17
1.7	Recursos aliados as técnicas Voltamétricas .....	17
1.71	Eletrodos Impressos.....	17
1.72	Surfactantes .....	18
1.73	Processamento matemático das curvas voltamétricas.....	18
1.8	Planejamento e análise de experimento .....	19
1.9	Planejamento fatorial completo.....	19
1.10	Superfícies de resposta .....	20
1.11	Preparo de amostra.....	21
2.0	OBJETIVOS .....	23
3.0	PARTE EXPERIMENTAL .....	24
3.1	Reagentes e solução .....	24
3.2	Equipamentos e análise eletroquímica .....	24
3.3	Limpeza do eletrodo .....	25
3.4	Aplicação da segunda derivada via correção da linha base.....	25
3.5	Preparo das amostras .....	26
3.6	Planejamento fatorial.....	27
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1	Eletro-oxidação das FQs .....	29
4.2	Estudos Voltamétricos .....	30
4.3	Estudos dos parâmetros inerentes a VPD .....	35

4.4	Estudo da variação de pH .....	36
4.5	Estudos da influência de surfactantes na resposta voltamétrica .....	38
4.6	Estudo da concentração do surfactante.....	40
4.7	Procedimentos matemáticos.....	42
4.6	Limpeza do EI.....	46
4.8	Otimização das condições de trabalho e obtenção da curva analítica .....	46
4.9	Preparo da amostra via microextração líquido-líquido .....	49
4.11	Otimização da MELL-SBD-AU.....	52
4.12	Desempenho do método .....	58
5.0	CONCLUSÕES .....	62
6.0	REFERÊNCIAS .....	63

### **1.0 INTRODUÇÃO**

A ciência tem avançado freneticamente, trazendo inúmeros benefícios à sociedade. Além do desenvolvimento tecnológico em torno dos celulares, computadores, máquinas agrícolas, construção civil, entre outros seguimentos, destacam-se os medicamentos de uso humano e veterinários. Em meio a este ritmo frenético de desenvolvimento, preocupações acerca dos fatores responsáveis por causar sérios danos ao ambiente e à saúde humana, envolvem a prevenção e controle da excreção de poluentes na natureza bem como métodos de detecção destes poluentes <sup>[1, 2]</sup>.

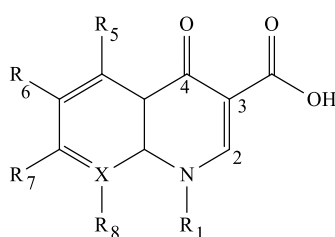
Com os avanços industriais, a poluição é um problema vigente, principalmente, quando relacionado com a qualidade de água potável. Outro ponto muito discutido nos últimos anos está relacionado com o crescente esgotamento da água em diversas regiões do mundo <sup>[3, 4]</sup>. Assim, além do caos provocado pela falta da água, destaca-se a contaminação com excessiva quantidade de poluentes como: antibióticos, hormônios e agrotóxicos entre outros contaminantes. Esta preocupação se estende, quando estes contaminantes apresentam elevada estabilidade após sua entrada no ambiente. Em muitos casos, têm sido relatado o desenvolvimento de superbactérias resistentes em ambientes aquáticos, as quais, quando ingeridas pelos indivíduos podem causar sérios problemas a saúde. Portanto, é de extrema importância o monitoramento da qualidade da água potável.

#### **1.1 Antibióticos**

Nos últimos anos houve um grande avanço na área médica, tendo como os mais significativos: o desenvolvimento de medicamentos e o diagnóstico precoce. Estes avanços tem melhorado a expectativa de vida da população, entretanto, estudos científicos tem constatado que a maioria desses medicamentos possui alta estabilidade e, o descarte gera acúmulo no ambiente aquático e nos alimentos em sua forma inalterada <sup>[5, 6, 7]</sup>. Assim, a ingestão destes medicamentos e suas possíveis reações alérgicas, podem ocorrer por duas vias, diretas e indiretas. Por via direta, prescrição médica, dar-se-á pelo tratamento com medicamentos altamente potentes, cuja ingestão causa reações adversas em vários

pacientes. Por vias indiretas, não intencionais, contudo, o consumo de alimentos e água potável, ambos contaminados, também podem provocar reações adversas, muitas vezes com efeitos potencializados devido à combinação com outras espécies presentes na natureza. Um exemplo desses medicamentos com efeitos adversos a saúde humana, são as quinolonas, as quais possuem amplas aplicações no combate de microrganismos responsáveis por infecções tanto em animais quanto em humanos [8]. Portanto, neste trabalho será destacada a classe de medicamento, cujas pesquisas e seu desenvolvimento são relativamente novos no cenário de antimicrobianos.

A evolução das quinolonas surgiu na década de 60, a partir da descoberta do ácido nalidíxico (Figura 1). Desde então, diversos estudos reportaram a modificação na estrutura do ácido nalidíxico com objetivo de alterar as propriedades farmacocinéticas e as atividades microbianas das quinolonas [9]. Os resultados mais promissores foram obtidos com a introdução do grupo piperazínico na posição 7 (R<sub>7</sub>) e a substituição do hidrogênio por um átomo de flúor na posição 6 (R<sub>6</sub>) do anel quinolônico (Figura 1) [9, 10, 11]. A partir da modificação do anel quinolônico na posição 6, todas as novas quinolonas passaram a ser chamadas de fluoroquinolonas (FQs). Estas modificações representaram, o grande avanço no combate as bactérias gram-negativas [10, 11, 12, 13, 14].



**Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido nalidíxico. R<sub>1</sub>... substituintes do anel quinolônico.

### 1.2 Fluoroquinolonas

Atualmente, as FQs estão entre a classe dos agentes antimicrobianos mais importantes e mais empregadas no combate a diversas infecções graves [9, 15]. São usadas na medicina humana, no tratamento de mais de 800 milhões de pacientes, variando desde o

tratamento de infecções do trato urinário, aparelho respiratório, trato gastrointestinal, pele, tecidos moles, infecções articulares, ósseas até doenças sexualmente transmissíveis [9, 15]. Na medicina veterinária é usada no tratamento de equinos, bovinos, suínos, caninos, felinos, cuniculares e píceos, no combate da mastite, metrite, pododermatite, enterites secundárias, infecções urinárias, colibacilose, salmonelose, pasteurelose, pleuropneumonia, rinite atrófica, pneumonia, enzoótica e broncopneumonia [15, 16]. Vale destacar que as FQs não são utilizadas apenas no tratamento de doenças infecciosas, também é usada em doses terapêuticas, para promover o crescimento de animais [17, 18, 19, 20].

Como supracitado as FQs constituem uma das classes de potentes antibióticos muito receitados em diversos tratamentos. Nas últimas décadas, diversos trabalhos — em países como a Índia [21], Brasil [22, 26], China [23, 24, 25, 26], Suíça [27], Japão [28], Estônia [29], Canadá, [34] e Estados Unidos [30, 36] entre outros — têm apontado a contaminação de ambientes aquáticos e até mesmo de alimentos, por resíduos, tanto na forma inalterada quanto na forma de metabólitos ativos destes antibióticos.

### **1.2 Efeitos colaterais**

Diversos antibióticos da classe das FQs com amplo espectro de ação foram retirados de comercialização, pois apresentaram efeitos toxicológicos e/ou reações alérgicas aos pacientes tratados com estes medicamentos. Além disso, tem-se constatado que o uso inadequado destes medicamentos pode afetar diretamente os sistemas músculo-esquelético, cardiovascular, nervoso central e periférico, circulatório, endócrino, gastrointestinal, urinário, fígado, cérebro, pele, sistemas sensoriais e visão [16, 31, 32, 33, 34], entre outros. Geralmente, os pacientes mais afetados ou os primeiros a sofrerem com estes efeitos são as crianças, os idosos e as gestantes. Neste caso, uma única dose (recomendada diariamente) é o suficiente para provocar reações adversas, nas quais os efeitos podem persistir por anos e os danos causados podem ser irreversíveis. Neste contexto, é de extrema importância o estudo desta classe de medicamentos para o desenvolvimento de métodos de controle do princípio ativo não metabolizado, em amostras

de interesse socioambientais como água potável, alimentos de origem animal, ambientes aquáticos em geral, entre outras.

### 1.4 Farmacopeias

Para controle e monitoramento da qualidade de medicamentos, no atual cenário mundial, têm sido destacados métodos alternativos de baixo custo e acessíveis às condições adversas. Portanto, a partir destas condições e a Tabela 1, a técnica que mais atende estes requisitos é a potenciometria, recomendado pelas farmacopeias brasileira e britânica, como método oficial para determinação de algumas FQs. Assim sendo, a potenciometria é uma técnica eletroquímica de uso comum nos laboratórios de química analítica e atende satisfatoriamente aos requisitos supracitados.

**Tabela 1.** Técnicas analíticas recomendadas pelas principais Farmacopeias, utilizadas como referência para determinação de FQs.

Farmacopeias	Técnica	Referências
Americana	CLAE	[35]
Brasileira	CLAE, espectrofotometria e potenciometria	[36]
Britânica	Espectroscopia (região do UV) ou potenciometria	[37]

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; UV = Ultravioleta Visível.

### 1.5 Métodos Alternativos

As técnicas de CLAE são consideradas como referência em análise de multicomponentes [38, 39]. Entretanto, apresenta custo relativamente elevado fato que diminui sua aplicação devido a falta de disponibilidade deste equipamento na maioria dos laboratórios. Assim, para a maioria das análises químicas, físicas e biológicas tem-se buscado o desenvolvimento de métodos alternativos: simples, rápidos, confiáveis e acessíveis. Ademais, em análise química, buscam-se as aplicações diretas no controle de

qualidade dos produtos farmacêuticos e monitoramento da concentração da droga em alimentos e amostras de interesse socioambiental.

### **1.6 Métodos Voltamétricos**

Os métodos voltamétricos apresentam certas similaridades aos métodos potenciométricos e são alternativas atraentes devido as seguintes vantagens: custo relativamente baixo, possibilidade de pré-concentração eletroquímica *in situ* (exclusivo dos métodos voltamétricos), sensíveis, rápidos, simples e capazes de eliminar interferentes constituintes da matriz <sup>[40, 41]</sup>. Além de fornecer informações do mecanismo de reação e a cinética dos processos eletródicos envolvidos <sup>[41]</sup>. Estas técnicas poderão ser úteis ao estabelecimento de novas legislações. Neste sentido, contribuir para um controle mais rigoroso da concentração destes medicamentos em níveis de traços.

### **1.7 Recursos aliados as técnicas Voltamétricas**

Nos últimos anos, houve uma grande evolução das técnicas eletroquímicas em relação à instrumentação, portabilidade e miniaturização. Destaca-se, ainda, a possibilidade da modificação do eletrodo de trabalho com objetivos de aumentar a sensibilidade e seletividade das técnicas durante a eletroanálise <sup>[42, 43]</sup>. Recentemente, novas tendências têm sido destacadas como sistemas portáteis de análise em tempo real, usando eletrodos impressos, meio micelar (uso de surfactante) e aplicação de métodos matemáticos na interpretação de sinais voltamétricos, o qual será comentado na sequência <sup>[44, 45, 46]</sup>.

#### **1.71 Eletrodos Impressos**

Os eletrodos impressos têm sido frequentemente usados, nas técnicas eletroquímicas, em razão de apresentar um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência impressos no mesmo suporte. Os eletrodos impressos apresentam características vantajosas como praticidade e simplicidade de operação, produção em larga escala e possibilidade de restauração da superfície <sup>[42, 43]</sup>. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, dependendo da superfície eletródica e da espécie de

interesse, pode ser usado para apenas uma única medida. Neste sentido, têm sido na literatura problemas de reprodutibilidade e repetibilidade. Mesmo sendo descartáveis, relatórios têm indicado procedimento de limpeza a fim de aumentar a vida útil e com as vantagens, mencionadas, tem sido um grande avanço para o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados [47, 48].

### **1.72 Surfactantes**

Os surfactantes são compostos de uma parte hidrofóbica (cauda) e outra hidrofílica (cabeça). Devido a estas características, os surfactantes têm capacidade de adsorverem espontaneamente sobre a superfície de diversos eletrodos de trabalho, sendo comum o seu uso em eletroanálise com o objetivo de formação de um filme organizado sobre a superfície em estudo [49, 50, 51, 52, 53, 54]. Os filmes organizados sobre a superfície de eletrodos de trabalho podem minimizar a adsorção de espécies químicas interferentes, influenciando diretamente na velocidade de transferência eletrônica bem como, no perfil e na intensidade do sinal voltamétrico [49, 51, 50, 55, 56, 57, 58]. Em análise simultânea, pode propiciar o deslocamento de potenciais e ajudar na separação de picos sobrepostos [59, 60]. Portanto, com todas estas características vantajosas, o uso de surfactantes em eletroanálises pode auxiliar no aumento da vida útil dos eletrodos bem como na discriminação de sinais em análise simultânea.

### **1.73 Processamento matemático das curvas voltamétricas**

Em termos de análise simultânea, tem sido discutido o uso de métodos matemáticos para separação de sinais voltamétricos, tais como: deconvolução, primeira e segunda derivadas. A diferença entre estes métodos está basicamente relacionada à precisão e a exatidão na interpretação dos sinais. Assim, a deconvolução apresenta como característica a separação dos sinais sobrepostos, a possibilitando aplicação em condições em que os potenciais estão extremamente próximos. Outro fator a ser definido, é a largura do pico, um requisito importante na interpretação da área do pico. Já os métodos derivados apresentam como características peculiares a possibilidade de separação com amplificação do sinal e, como



consequência, os pontos de inflexões na formação do sinal podem ser definidos com extrema precisão. Entretanto, nos métodos derivativos, exige-se que os potenciais de picos sejam apenas parcialmente sobrepostos, o que inviabiliza a aplicação em casos de extrema sobreposição de potenciais. Desta forma, ambos os métodos apresentam vantagens na separação de picos sobrepostos em análises simultâneas e têm sido difundidos em diversas áreas como: cromatográficas, eletroanálise, termogravimétricas e espectroscópicas [61, 62, 63]. Devido as suas características peculiares, ambos os métodos matemáticos podem ser usados como alternativas relevantes na separação de sinais voltamétricos sobrepostos.

### **1.8 Planejamento e análise de experimento**

Os métodos quimiométricos são alternativas atraentes em análises envolvendo um grande número de ensaios. Oferece como vantagens a redução do números de experimentos, qualidade na interpretação dos ensaios, análise de mais de uma variável ao mesmo tempo, redução de gastos e pode ser aplicado em diversas áreas de conhecimento [64, 65]. Sendo assim, são muito usado nas técnicas de preparo de amostras que requerem várias etapas de processamento, onde o planejamento experimental é uma alternativa extremamente importante para a redução de experimentos bem como na interpretação das respostas.

#### **1.81 Planejamento fatorial completo**

O planejamento fatorial permite investigar todas as variáveis experimentais combinadas e analisar as respostas em termos de seus efeitos e suas interações envolvidas em um número reduzido de experimentos. Para a combinação das variáveis, normalmente utiliza-se dois níveis para cada variável, um nível máximo (+1, valor codificado) e um nível mínimo (-1, valor codificado). Assim, esta relação é estabelecida por  $2^n$ , onde  $n$  é o número de variáveis. O valor codificado para os níveis +1 e -1 é dependente apenas da variável a ser analisada, ou seja, um critério a ser definido pelo especialista [64]. Os dados obtidos a partir das respostas médias são aplicados a uma matriz de contraste, na qual os efeitos da coluna são dados pelas equações 1 e 2. Nas equações,  $n$  é o número de ensaios,  $y_i$  são as

observações individuais,  $y_i (+)$  e  $y_i (-)$  são as respostas médias das observações no nível +1 e -1.

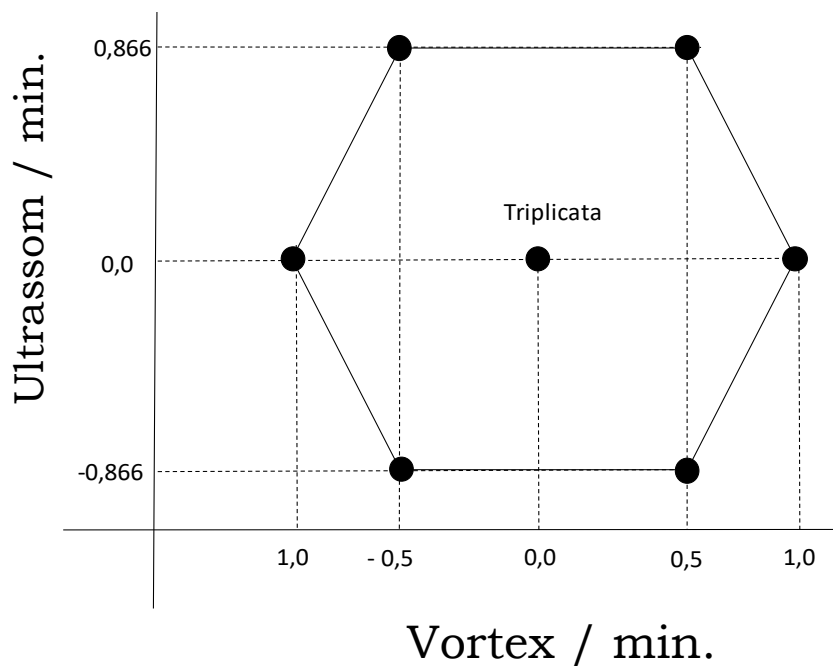
$$Efeito\ médio = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad \text{Equação 1}$$

$$Efeito = \frac{\sum_{i=1}^n y_i(+)-\sum_{i=1}^n y_i(-)}{n/2} \quad \text{Equação 2}$$

A equação 1 é aplicada para o efeito da média de todas as observações, enquanto que a equação 2 é aplicada para o efeito das variáveis e interações usando a diferença entre os níveis +1 e -1. Para a aplicação e interpretações dos resultados, existem diversos softwares disponíveis gratuitamente na internet que realizam estas tarefas. Entre estes, citam-se Octave [66], R [66], planilhas eletrônicas [67], além de vídeos didáticos e livros demonstrando os processos quimiométricos envolvidos [68, 69].

### 1.82 Superfícies de resposta

Após a realização do planejamento experimental e obtenção das respostas, é possível discernir os fatores mais significantes. Estes fatores são selecionados e aplicados em uma metodologia de resposta, com o intuito de obter a sensibilidade da variável resposta em alguns pontos de máxima influência [64]. Esta metodologia é um modelo matemático empírico que tem sido aplicado para descrever o modelo de funções polinomiais lineares ou quadráticas. Na literatura existem diversos modelos matemáticos reportando metodologias de superfície de resposta, entretanto, neste trabalho destacaremos a matriz Doehlert, a qual é apresentada na Figura 2, em um esquema ilustrativo. Para um número reduzido de experimentos sendo =  $K^2 + K + pc$ ,  $k$  é o número de fatores e  $pc$  é número de experimentos no ponto central [67].



**Figura 2.** Ilustração da matriz Doehlert com duas variáveis.

### 1.9 Preparo de amostra

Os métodos voltamétricos têm sido aplicados como alternativas valiosas para atender aos requisitos básicos que envolvam determinação de fármacos, principalmente, em formulações farmacêuticas e algumas matrizes biológicas. Mesmo com inúmeros avanços em eletroanálises pouco tem sido relatado sobre o preparo de amostra. Todavia, em amostras mais complexas como aquelas provenientes de ambientes aquáticos, tecidos animais e amostras de solos, o nível de interferência é maior e o preparo de amostra é fundamental na obtenção dos resultados. No desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, a matriz pode apresentar níveis significantes de interferência sendo imprescindível a etapa de preparo de amostra, pois a presença de interferentes pode inativar a superfície do eletrodo ou até mesmo proporcionar a sobreposição de sinais [70, 71].

O desenvolvimento de métodos com o objetivo de quantificar o percentual dos medicamentos não metabolizados em amostras complexas é viável e o preparo de amostra é imprescindível. Dentre as técnicas de preparo de amostra, destaca-se a microextração líquido-líquido (MELL) que tem recebido considerável atenção após sua descoberta por

Rezaee e colaboradores <sup>[72]</sup>. O enfoque desta nova técnica foi a introdução de um solvente dispersor na combinação extrator e amostra (em geral água), na qual pode-se diminuir a quantidade de solvente extrator sem prejudicar a recuperação dos analitos de interesse <sup>[73]</sup>. Desde então, inovações nos procedimentos tem sido proposto com objetivo de aumentar a eficiência e diminuir o tempo de análise. As adaptações na MELL incluem: (i) uso de ultrassom para facilitar a formação de microgotas e como, consequência, aumentar o contato entre as fases líquidas <sup>[74, 75]</sup>, (ii) adição de sais para aumentar a separação entre as fases aquosas e orgânicas, (iii) uso de líquidos iônicos como solventes extratores para aumento da capacidade de extração e, principalmente, substituição de solventes orgânicos tóxicos <sup>[76, 77, 78]</sup>.

Diante das informações supracitadas, neste trabalho propomos um método de preparo de amostras para a determinação simultânea das FQs levofloxacina (LEVO), norfloxacina (NOR) e danofloxacina (DANO) usando procedimentos matemáticos aplicados na separação dos sinais sobrepostos associado a técnica de microextração líquido-líquido assistida por ultrassom e solvente de baixa densidade (MELL-AU-SBD).

## **2.0 OBJETIVOS**

Considerando a contaminação por antibióticos, em sistema de abastecimento de água potável, pretende-se desenvolver um método para determinação simultânea de LEVO, NOR e DANO em amostras de águas de torneiras contaminadas com estas FQs. Tendo como base técnicas de baixo custo e acessível, pretende-se utilizar as técnicas voltamétricas para identificar, quantificar e pré-concentrar tais espécies em amostras de interesse socioambiental.

Aplicar processamentos matemáticos dos sinais voltamétricos que apresentarem sobreposição de sinais.

Comparar os métodos de pré-concentração eletroquímica com o sistema de microextração líquido-líquido adaptado.

### **3.0 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Reagentes e soluções**

Soluções padrão estoque das FQs LEVO, NOR, e DANO foram preparadas na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  por dissolução de quantidade apropriada em 1,0% de metanol (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,5 % de ácido acético (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) e, posterior diluição em água ultrapura. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque padrão no intervalo de concentração de 0,008 a  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Estes e outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

Como eletrólito suporte utilizou-se a solução tampão Britton-Robinson preparada pela mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, todos na concentração de  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ . O ajuste do pH foi realizado com solução de ácido clorídrico e hidróxido de sódio ambos na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os surfactantes utilizados foram: lauril sulfato de sódio (LSS), cloreto de tetraetil amônio (CTEA), dioctil sulfocinato de sódio (DSS), brometo de tetrabutil amônio (BTBA) e triton X-100 (TX-100). Todas as soluções foram preparadas na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  por dissolução de quantidade apropriada em água ultrapura e, as respectivas diluições no intervalo de concentração de 0 a  $350 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , foram realizadas diretamente no eletrólito suporte.

#### **3.2 Equipamentos e análise eletroquímica**

Todas as medidas e/ou ajuste de pH foram realizadas com eletrodo de vidro combinado (Hanna®, modelo HI 1131B, Texas, Estados Unidos) conectado a um pH-metro (Hanna®, modelo HI 3221, Texas, Estados Unidos). Água utilizada para o preparo de todas as soluções foi obtida a partir de um sistema de osmose reserva (condutividade  $0,055 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ) e/ou ultrapurificada (resistividade  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

Para o procedimento de extração MELL-SBD-AU foram utilizados tubos cônicos de 15 e/ou 50 mL (Falcon®, Curitiba, PR, Brasil), vortex (Fisatom®, model 774, São Paulo, Brazil) e centrífuga (Hettich®, EBA 200, Tuttlingen, Alemanha). Para a dissolução e

homogeneização das soluções utilizou-se um ultrassom (Branson<sup>®</sup>, model 1800, New York, United States).

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 204 (Metrohm Autolab<sup>®</sup>, Utrecht, Holanda), controlado pelo software Nova 1.11. Como sistema eletroquímico foi utilizado um conector específico obtido da DropSens<sup>®</sup> (DRP-DSC), o qual permite interfacear o eletrodo impresso (EI) com o equipamento e possibilita adaptações para trabalhos com microvolumes de soluções. As medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata e os resultados são equivalentes à média aritmética.

Os EIs foram adquiridos da Drop-Sens<sup>®</sup> (Oviedo, Spain), composto por uma placa de cerâmica de dimensões: 3,4 cm × 1,0 cm × 0,05, (largura × comprimento × altura), contendo os três eletrodos e seus respectivos contatos elétricos. Sendo estes eletrodos um contra eletrodo de carbono, um eletrodo de pseudo-referência de prata e um eletrodo de trabalho no qual foram testados diferentes materiais carbonáceos: carbono, grafeno, fibra de carbono e nanotubos de carbonos.

### **3.3 Limpeza do eletrodo**

Foi realizada a limpeza da superfície, a cada medida eletroquímica, usando álcool isopropílico (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) seguido de água ultrapura. Após o eletrodo secar por tempo de aproximadamente 5 minutos, em temperatura ambiente, registrou-se um voltamograma de pulso diferencial (VPD) na presença apenas do eletrólito de suporte (tampão BR, pH 5,0), na janela de potencial de 0,2 a -0,4 V vs Ag. Este procedimento foi utilizado com objetivo de aumentar a vida útil dos eletrodos e assim reduzir a passivação por envenenamento da superfície durante as medidas.

### **3.4 Aplicação da segunda derivada via correção da linha base**

Após a obtenção do voltamograma original, foi realizado o procedimento matemático de segunda derivada para melhorar a separação dos picos bem como precisão nas medidas da intensidade de corrente de pico. Tal procedimento matemático pode ser aplicado tanto pelo software Origin<sup>®</sup> (versão 8,5) quanto pelo software Nova 1.11 (Metrohm Autolab<sup>®</sup>). No

software NOVA 1.1, o procedimento foi realizado inserindo automaticamente a função derivativa (2 vezes, derivada de segunda ordem) nos valores de corrente e potencial da técnica de VPD. No software Origin<sup>®</sup>, o procedimento foi realizado inicialmente com a função “*smoothed*” (suavizador, fator 2), de acordo com o algoritmo de Savitsky-Golay, para discriminação dos ruídos de rede e melhor definição do sinal. Em seguida, aplicou-se a função derivativa de segunda ordem, obtendo a segunda derivada do potencial em função da variação da corrente. Este procedimento foi importante não só para a separação dos picos voltamétricos como também na amplificação dos sinais, especialmente para a DANO que, além de apresentar menor intensidade também houve maior sobreposição de pico. Finalmente, foi realizado o procedimento de correção da linha base antes e após à aplicação da segunda derivada utilizando o software Origin<sup>®</sup>.

### 3.5 Preparo das amostras

As amostras de água da torneira foram coletadas na rede de abastecimento do Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da Grande Dourados (Dourados, MS, Brasil). Tais amostras foram armazenadas em frascos escuros, estocadas em temperatura de 4,0 °C, e analisadas sem nenhum tratamento prévio. Todos os frascos e vidrarias usados foram imersos em solução de ácido nítrico 10%, por 12 horas, para limpeza e, a seguir, lavado três vezes com água ultrapura.

Após a contaminação das amostras com LEVO, NOR e DANO em concentração de: 3,0, 2,6, 2,9 e 30, 26, 29  $\mu\text{g L}^{-1}$ , realizou-se a análise eletroquímica, e não obteve sinais provenientes de tais espécies químicas. Assim, realizou-se o procedimento de extração via MELL-SBD-AU, em tubos Falcon<sup>®</sup> de 15 e/ou 50 mL, adicionando 10 ou 35 mL da amostra de água contaminada na concentração desejada das FQs. Em seguida, ajustou-se o pH das amostras com ácido acético (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) ou hidróxido de amônio (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) para atingir valores de 2,0, 6,7 e 10. Sobre a solução resultante, foi adicionado NaCl, concentração entre 5,0 e 25 % (m/V), agitado vigorosamente os tubos em vortex até a dissolução completa do sal.



Na etapa seguinte, adicionou-se a acetona (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) como solvente extrator em frações que variou entre 12,5 e 25% (v/v). As amostras foram agitadas novamente em vortex e, posteriormente, ultrassonificada sob temperatura constante de 60 °C. Por fim, para obtenção da fração enriquecida das FQs, as amostras foram centrifugadas por 5,0 minutos à 3000 rpm. Os estudos destes parâmetros instrumentais, vortex, ultrassom e centrifuga, foram realizados com uso de planejamento fatorial completo, 2<sup>3</sup>, avaliando-se o tempo de 15 minutos como ponto máximo (+) e o tempo mínimo de 5 (-) como tempo mínimo. Mais detalhes sobre este estudo serão fornecidos na seção 3.6.

A fase enriquecida, fase orgânica obtida com solvente de baixa densidade (acetona), foi retirada com uma microseringa e adicionada em um eppendorf, o qual foi levado para estufa em temperatura de 60 °C. Após a evaporação do solvente orgânico, o resíduo foi redissolvido no próprio eletrólito suporte com adição de alíquotas de 150 ou 200 µL do tampão BR (pH 5,0). Em seguida, adicionou-se o surfactante em concentração apropriada e, antes das análises, homogeneizou-se as soluções em ultrassom por 1,0 minuto.

O efeito matriz foi testado pela adição e recuperação dos analitos nas amostras, usando o método de adição do padrão. Para tal, subdividiram-se as soluções enriquecidas em alíquotas de 30 µL e, em seguida, adicionou-se gotas destas soluções diretamente na superfície do EI (método chamado de “*droplet-based*”).

Para calcular o fator de enriquecimento utilizou-se os dados obtidos com o método de adição de padrão. Com o uso da equação 3, foi calculado o fator de enriquecimento (FE), em que C<sub>obt</sub> é a concentração do analito na fase orgânica e C<sub>o</sub> é a concentração inicial do analito na amostra de água da torneira.

$$FE = \frac{C_{obt}}{C_o} \quad \text{Equação 3}$$

### 3.6 Planejamento fatorial

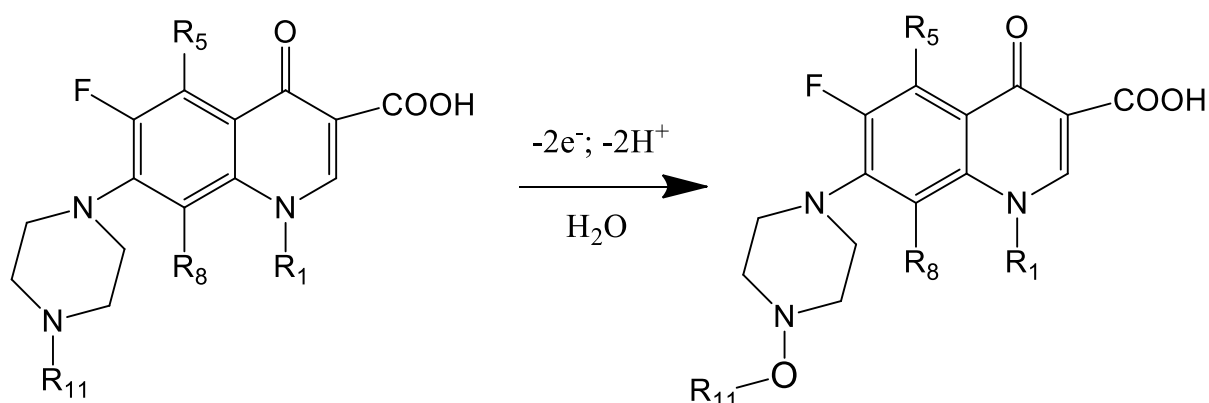
Para otimizar o tempo do procedimento de extração via MELL- AU-SBD, utilizou-se o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, estudando, em duplicata, as seguintes variáveis: agitação via vortex, ultrassonificação e centrifugação, avaliando o tempo de 15 minutos (+) e 5 minutos

(-), para cada uma das variáveis. A análise do planejamento fatorial interpretado pelo diagrama de Pareto e os resultados mais significantes foram estudado na matriz Doehlert, sendo os ensaios realizados de forma aleatória com ponto central realizado em triplicata. A resposta analítica foi obtida em termo de recuperação para as FQs, LEVO NOR e DANO. O tratamento estatístico foi realizado pelo software Statistica 10,0 (StatSoft Statistica®, Tulsa, Estado Unidos), empregando 95 % de confiança. Os resultados foram obtidos com três medidas experimentais, sendo demonstrado pela média e o respectivo desvio padrão.

## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

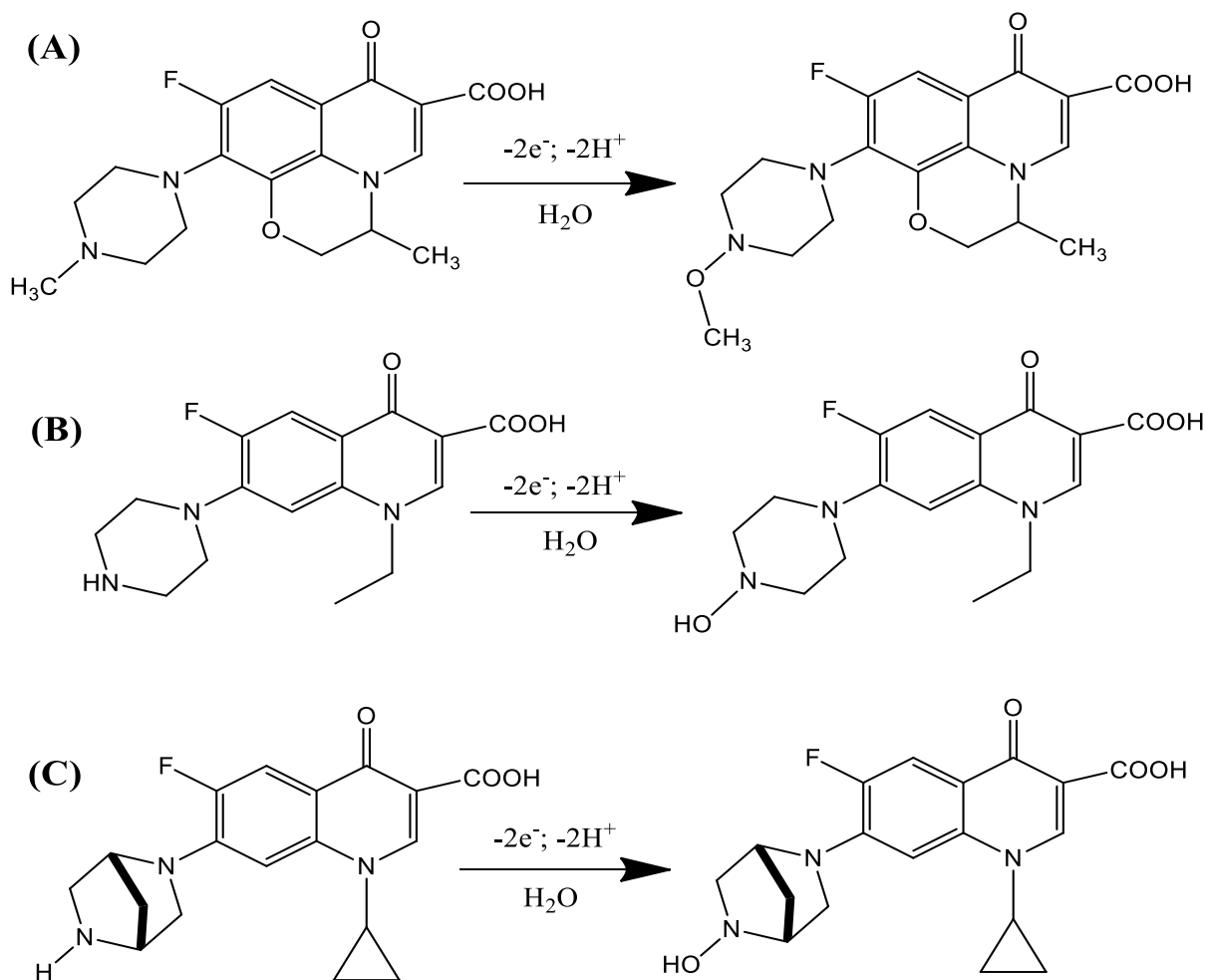
### 4.1 Eletro-oxidação das FQs

De acordo com trabalhos anteriormente publicados [79, 80], a oxidação eletroquímica para algumas FQs ocorre no grupo piperazinil em um processo irreversível. Na Figura 3, é apresentado um esquema geral no qual estão envolvidos dois elétrons e dois prótons para a oxidação do grupo piperazinil ligado na posição 7 do anel quinolônico.



**Figura 3.** Estrutura básica das FQs e o esquema geral de eletro-oxidação do grupo piperazinil.

Para as FQs LEVO, NOR e DANO, devido as semelhanças estruturais, têm sido observado o mesmo esquema geral de eletro-oxidação observado na Figura 4. O que difere no processo de oxidação são basicamente os fatores cinéticos e termodinâmicos [81]. Sendo assim, espera-se que na eletroanálise simultânea das três FQs ocorra à sobreposição dos sinais voltamétricos.

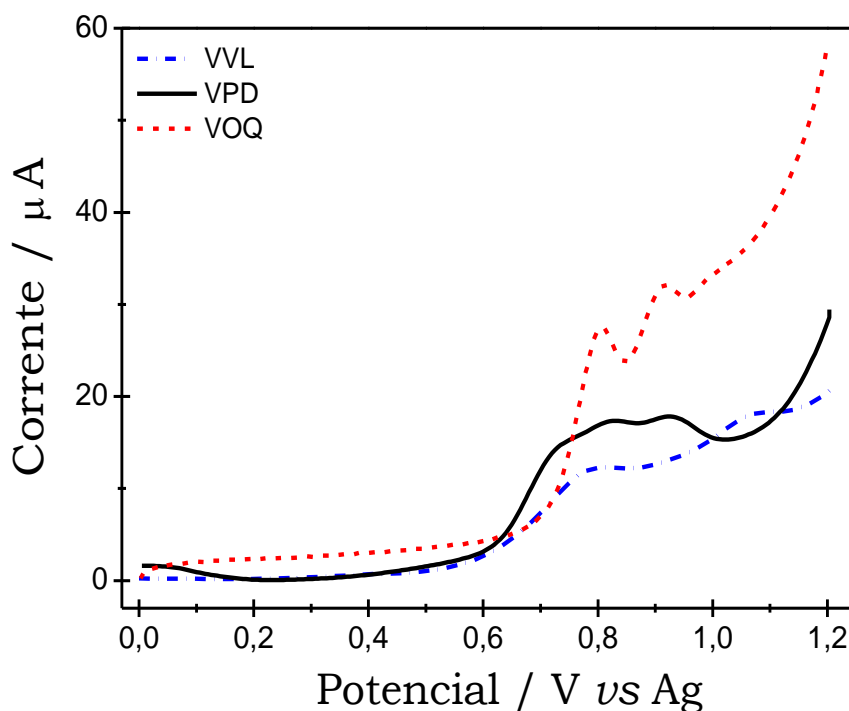


**Figura 4.** Esquema geral para a oxidação das FQs LEVO <sup>[82]</sup> (A), NOR <sup>[83]</sup> (B), e DANO <sup>[84]</sup> (C).

## 4.2 Estudos Voltamétricos

Para demonstrar a resposta voltamétrica referente a oxidação simultânea, Figura 5, observam-se os voltamogramas registrados com as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de varredura linear (VVL) e voltametria de onda quadrada (VOQ), para estudar simultaneamente o comportamento voltamétrico das FQs LEVO, NOR e DANO. Como pode ser observado, comparando os perfis voltamétricos obtidos com as três técnicas, a VOQ foi a que originou picos mais intensos e ligeiramente separados, tanto para LEVO quanto para NOR. Entretanto, o terceiro pico referente a oxidação da DANO, foi totalmente suprimido devido à proximidade com a sobrepotencial de oxidação do próprio eletrólito suporte (solvente). Com relação a comparação da eficiência entre as três técnicas,

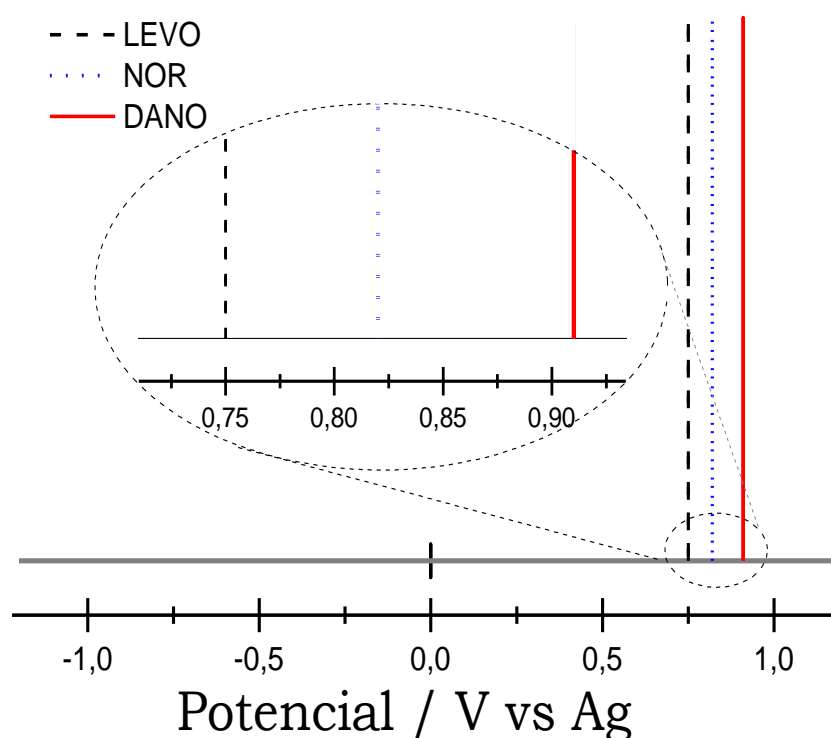
embora a VPD não tenha originado picos mais intensos, verifica-se que há ocorrência de sinais perceptíveis (mensuráveis) em potenciais de 0,75 V (LEVO), 0,82 V (NOR) e 0,91 V (DANO). Além disso, verifica-se para a VPD que os processos faradaicos estão significativamente deslocados para valores menos positivos, quando comparados com aqueles obtidos com as técnicas de VOQ e VVL. Portanto, a VPD apresentou a maior separação entre os picos, referentes as espécies analisadas, e assim melhorou a discriminação de ambos sinais. Desta forma, a utilização de VPD permite a análise simultânea de LEVO, NOR e DANO na mesma solução concomitantemente, sendo esta técnica escolhida para conduzir os demais experimentos.



**Figura 5.** Voltamogramas de: PD (—), VL (---) e OQ (---), registrado sobre a superfície de EI-NFC, para oxidação de LEVO, NOR e DANO ( $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Condições experimentais: Tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0). Parâmetros: VPD: Incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) = 10 mV,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , Amplitude ( $E_{sw}$ ) = 25 mV, tempo de pulso = 10 ms. VVL: velocidade de varredura ( $v$ ) =  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . VOQ: frequência ( $f$ ) = 25 Hz,  $E_{sw} = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ .

Na Figura 6 estão reunidos de forma ilustrativa os três sinais voltamétricos para a oxidação individual de cada uma das FQs LEVO, NOR e DANO, os quais ocorrem em uma

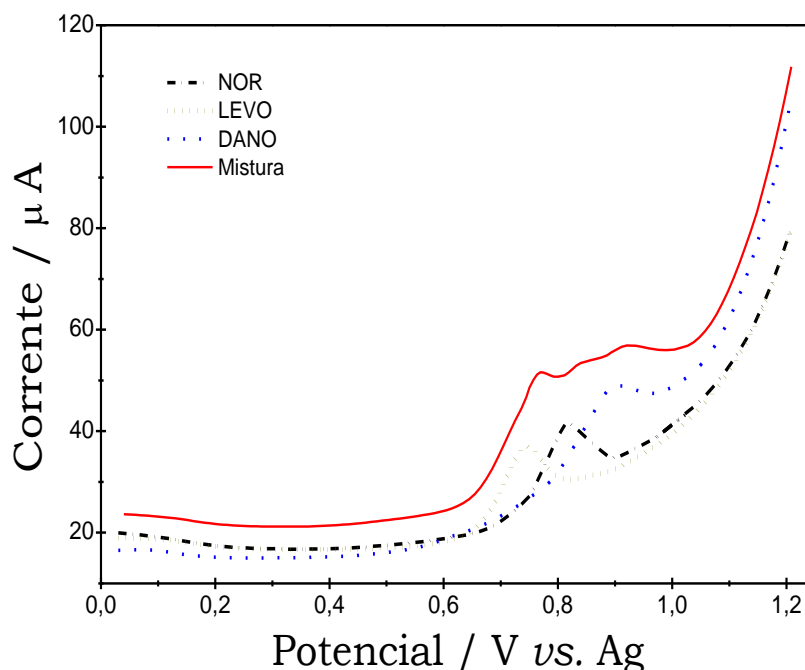
faixa de potencial de 160 mV, ou seja, uma faixa de potencial muito estreita para ocorrer, simultaneamente, a oxidação das três FQs. Neste caso, a LEVO oxida em um potencial de 0,75 V (---), NOR em 0,82 V (.....) e DANO em 0,91 V (—), cujo intervalo de potencial máximo de oxidação ( $E_p$ ), entre os picos, é menor que 100 mV para cada uma das FQs de interesse. Sendo assim, dentre as técnicas voltamétricas estudadas, a VPD é a mais indicada para este caso, pois possibilita discriminar melhor os sinais para as FQs quando detectadas simultaneamente.



**Figura 6.** Esquema ilustrativos para os potenciais de oxidação das FQs, LEVO (---), NOR (.....) e DANO (—). Condições experimentais e instrumentais, realizado com a técnica de VPD, apresentadas na Figura 5.

Após a escolha da técnica de VPD, estudou-se o comportamento voltamétrico das FQs, quando detectadas, tanto individualmente quanto simultaneamente (Figura 7). Quando a detecção das FQs é realizada de forma individual, verifica-se que os perfis voltamétricos são bem definidos e é possível distinguir com precisão cada pico. No entanto, quando a detecção é realizada de forma simultânea, a identificação do sinal de cada FQ fica

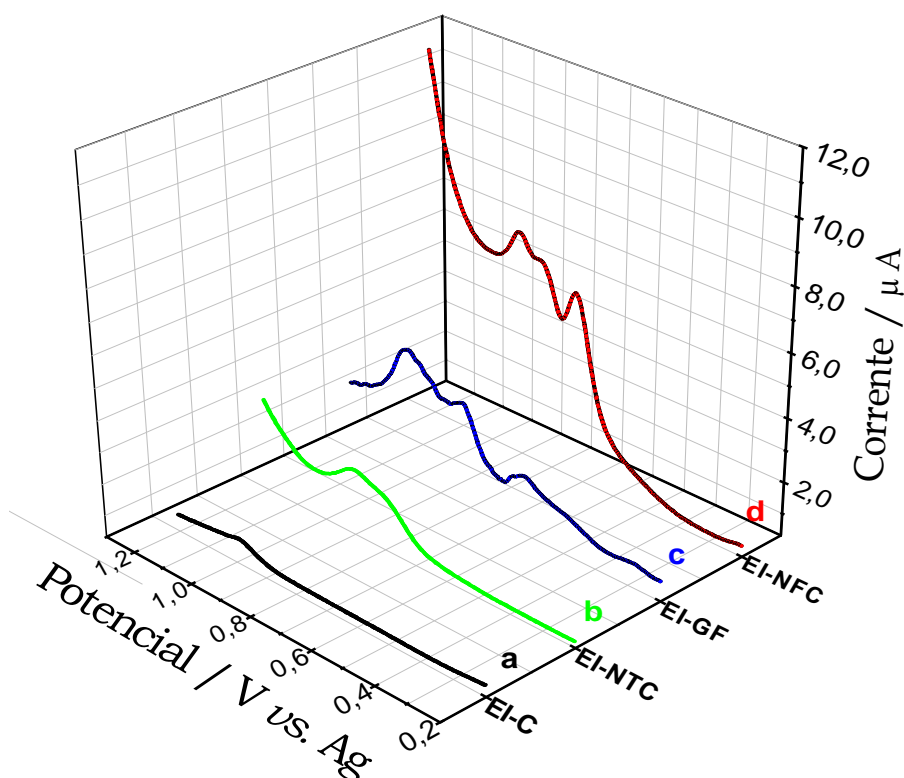
totalmente comprometida, necessitando de um estudo mais criterioso para separar satisfatoriamente os picos referentes a cada FQ.



**Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial registados para eletro-oxidação de  $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ , individual de LEVO (.....), NOR (- · -) e DANO (- · -) e simultâneo (—), sobre a superfície de EI-NFC. Condições experimentais: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0). Parâmetros da DPV:  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV}$ .

Diante dos resultados supracitados, observou-se que, mesmo usando a técnica de VPD, não foi possível separar satisfatoriamente os sinais provenientes da oxidação simultânea das três FQs (Figura 7). Neste contexto, têm sido usados diferentes materiais eletródicos, para melhorar a separação de sinais proveniente de detecção simultânea. Portanto, com o objetivo de superar as limitações encontradas na detecção simultâneas das FQs, LEVO, NOR e DANO foram avaliados outros eletrodos de trabalho, contendo outros materiais carbonáceos, como superfícies eletródicas. Assim, foram realizadas medidas de VPD, contendo LEVO, NOR e DANO, empregando os eletrodos impressos de carbono (C), nanotubos de carbono (NTC), grafeno (GF) e nanofibra de carbono (NFC) como eletrodo de trabalho.

Na Figura 8, estão reunidos os voltamogramas registrados nas diferentes superfícies eletródicas. Os resultados, apresentados, indicam que as superfícies de C e NTC, apresentaram pouca efetividade para mediar as reações de oxidação das FQs, uma vez que a magnitude dos picos foram pouco pronunciados ou até não mensuráveis. Para as medidas empregando os eletrodos impressos modificados com GF e NFC observa-se que, além da ocorrência de picos mais pronunciados para as três espécies avaliadas, houve uma ligeira separação entre os potenciais de pico de oxidação. Assim, pode-se inferir que os EIs modificados com NFC (EI-NFC) apresentam vantagens quando comparados ao GF e aos demais eletrodos avaliados. Portanto, os EI-NFC foram escolhidos para conduzir os demais experimentos voltamétricos.



**Figura 8.** Voltamogramas de PD registrados para LEVO, NOR e DANO ( $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre a superfície de (a —) EI-C (b —) EI-NT (c —) EI-GF e (d —) EI-NFC. Parâmetros: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0),  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .



### 4.3 Estudos dos parâmetros inerentes a VPD

Para a avaliação das melhores condições, dos parâmetros instrumentais inerentes a técnica de VPD, foram realizadas medidas na presença de LEVO, NOR e DANO com concentração de  $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A escolha das melhores condições foi um compromisso entre a intensidade de sinal e resolução voltamétrica (medindo a largura do pico a meia altura). Na Tabela 2 estão reunidos os parâmetros estudados, incremento de potencial, amplitude do pulso, velocidade de varredura e tempo de equilíbrio, juntamente com os valores otimizados.

**Tabela 2.** Condições experimentais e instrumentais utilizados e otimizados para técnica de VPD.

Condições instrumentais da VPD		
Parâmetros	Intervalo testado	Otimizados
Incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) / mV	1,0 – 10	4,0
Amplitude do pulso ( $E_{sw}$ ) / mV	15 – 140	25
Velocidade de varredura ( $\nu$ ) / mV s <sup>-1</sup>	2,0 – 20	10
Tempo de equilíbrio / s	0 – 30	5,0

Para o estudo do incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ), foi observado um aumento na intensidade de sinal de pico anódico com o aumento dos valores de  $\Delta E_s$ . Entretanto, com o aumento dos valores de  $\Delta E_s$  houve menor identificação dos sinais, o que conseqüentemente causa uma maior sobreposição dos sinais, provavelmente, pelo fato de que em altos valores de  $\Delta E_s$  há diminuição do número de pontos e, isso é um fator importante na separação dos sinais provenientes da oxidação simultânea das três FQs. Portanto, como melhor valor para o  $\Delta E_s$  foi escolhido 4,0 mV. Para avaliar a amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais ( $E_{sw}$ ), verificou-se que os sinais voltamétricos foram estreitos e bem definidos em valores de  $E_{sw}$  entre 15 e 25 mV. Sendo assim, neste estudo foi escolhido o valor de 25 mV como melhor parâmetro para o estudo da  $E_{sw}$ .

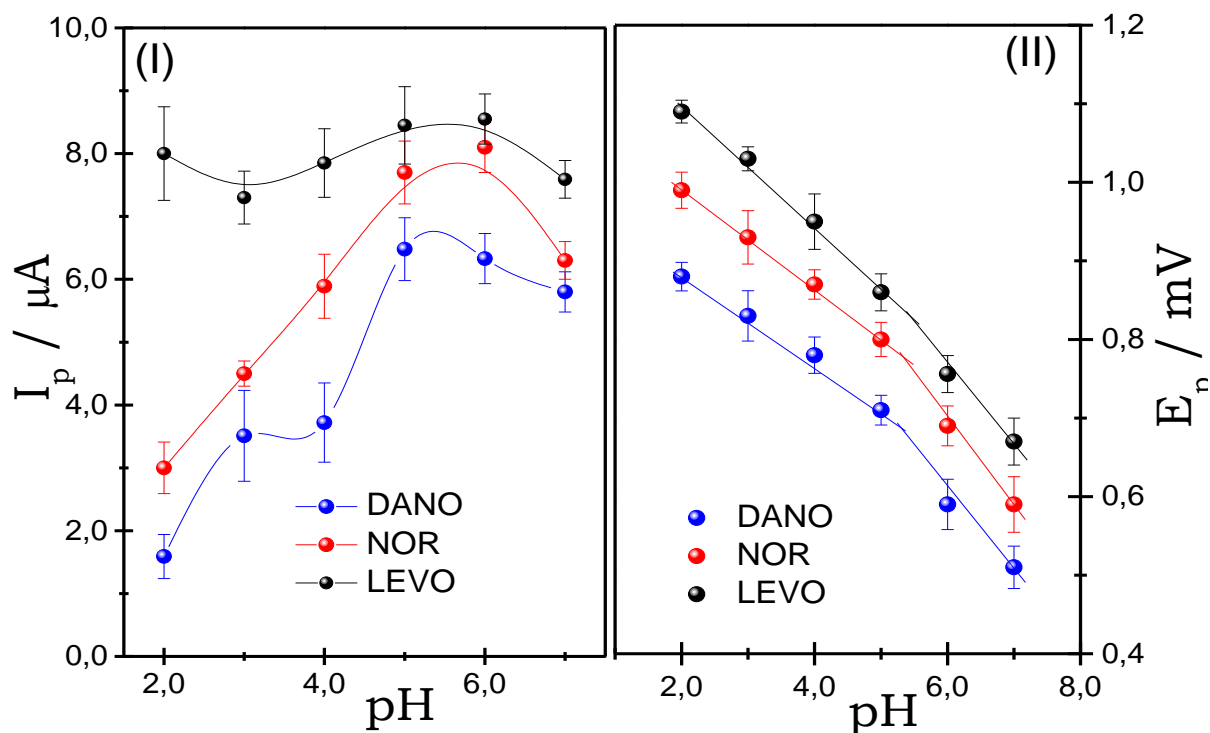
Outro parâmetro estudado foi a velocidade de varredura ( $v$ ), um dos parâmetros que mais influência na separação de picos em análises simultâneas. Isto deve-se ao fato de que, em baixas velocidades de varredura, há uma melhor discriminação da relação (maior razão) sinal/ruído e, isso possibilita uma melhor identificação dos sinais referentes a eletro-oxidação das FQs. Neste estudo, foi observado que a partir de  $20 \text{ mV s}^{-1}$  não era possível discernir os sinais provenientes de cada uma das FQs. Portanto, optou-se por utilizar a velocidade de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  para conduzir os experimentos subsequentes, pois além de apresentar uma intensidade da corrente de pico satisfatória, possibilitou a melhor separação dos sinais das três FQs.

Também foi estudado o tempo de equilíbrio, com objetivo de diminuir a contribuição da corrente capacitiva, entretanto, não foram observados efeitos significativos no sinal para os diferentes valores de tempo de equilíbrio avaliados. Portanto, optou-se pelo valor de 5 s, menor valor de tempo de equilíbrio, como valor de referência para conduzir os demais experimentos voltamétricos. Mesmo não influenciando significativamente o tempo de equilíbrio é necessário, principalmente, quando há presença de espécies iônicas uma vez que ocorre maior polarização do eletrodo e como consequência ocorre uma maior polarização do eletrodo de trabalho aumentando a corrente de fundo.

#### **4.4 Estudo da variação de pH**

O estudo do eletrólito suporte é outro fator de extrema importância para obtenção de voltamogramas com maior resolução e, picos mais definidos com intensidade de corrente considerável, o que melhora a discriminação dos sinais em uma análise simultânea. Assim, estudou-se a mistura dos ácidos fosfórico, bórico e acetato, ajustando o pH com hidróxido de sódio, próximo aos valores de  $pK_a$  dos respectivos ácidos, contemplando o efeito de tamponamento em uma ampla faixa de pH de 3,0 a 7,0. Na Figura 9, observa-se que variação da concentração de íons  $H^+$  afeta significativamente nos valores de corrente de pico ( $I_p$ , Figura 9I) e no potencial de pico ( $E_p$ , Figura 9II). Com base na Figura 9 I é possível observar aumento significativo da intensidade de corrente de pico, para as espécies NOR e

DANO, com o aumento do valor de pH, atingindo o máximo em pH 5,0. Já para LEVO a variação do valor de pH não interferiu nos valores de intensidade de corrente anódica. Uma possível explicação, é o fato de que mesmos em baixos valores de pH o grupamento amina (terciário) ligado na posição R<sub>1</sub> não é protonado diferentemente das demais estruturas. Como consequência, a ausência desta protonação facilita o processo redox em baixos valores de pH. Com base na intensidade de corrente de pico, para diferentes valores de pH, houve um deslocamento do potencial de oxidação *versus* pH, o qual foi correlacionado com a intersecção dos intervalos lineares. Tal intersecção tem sido usado como indicativo de mudança na estrutura química das respectivas FQs, associado ao pKa, cujos valores podem ser observados na Tabela 3. A presença de dois pKa, para cada FQ, pode ser justificado devido a presença do grupo carboxílico na posição 3 e um grupo amina secundário protonado na posição 7.



**Figura 9.** Influência do pH em função da corrente de pico (I) e do potencial de pico (II). Registrado para eletro-oxidação das FQs LEVO, NOR e DANO ( $18 \mu mol L^{-1}$ ), sobre a superfície de EI-NFC em tampão BR  $0,04 mol L^{-1}$  (pH 5,0). Parâmetros da VPD:  $\Delta E_s = 4,0 mV$ ,  $E_{sw} = 30 mV$  e  $v = 10 mV s^{-1}$ .

**Tabela 3.** Valores de pKa das FQs: LEVO, NOR e DANO.

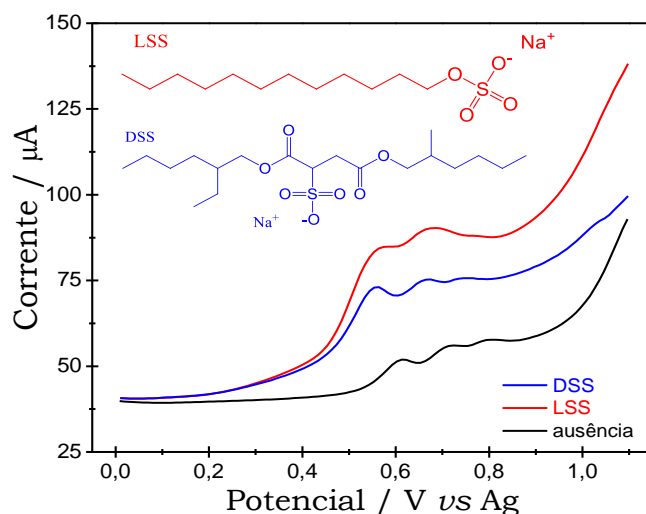
FQs	LEVO	NOR	DANO
pKa <sub>1</sub>	5,45	5,77	5,65
pKa <sub>2</sub>	6,20	8,68	6,73

#### 4.5 Estudos da influência de surfactantes na resposta voltamétrica

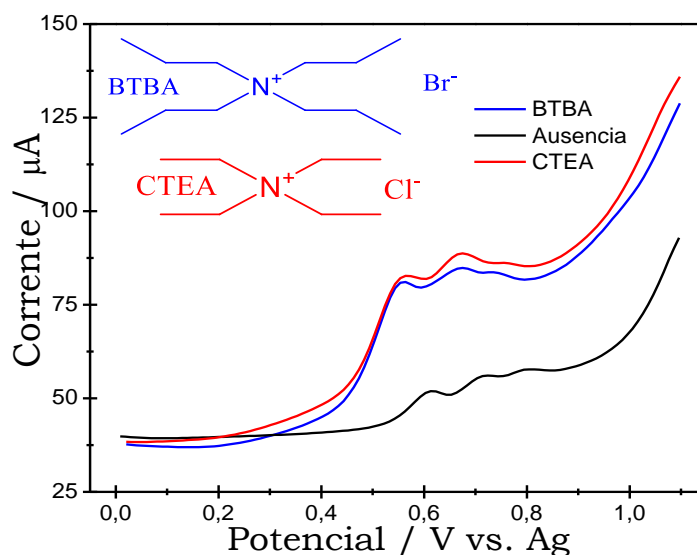
Em função da necessidade da melhor separação dos picos de oxidação entre as três espécies analisadas, foi avaliada a influência da presença de surfactantes na solução de medida. Os surfactantes têm sido usados em detecção simultânea não só com o objetivo de melhorar a separação de picos voltamétricos parcialmente sobrepostos como também promover o ganho de sinal. Ademais, estudos também revelam que o uso de surfactantes pode aumentar a vida útil dos eletrodos impressos, pois suas características anfifílicas auxiliam na diminuição do efeito de envenenamento da superfície do eletrodo trabalho [49, 51, 50, 58, 59, 60]. Neste sentido, estudos foram realizados na ausência e na presença dos seguintes surfactantes aniônicos: lauril sulfato de sódio (LSS, —) e dioctil sulfosuccinato de sódio (DSS, —) Figura 10; catiônicos: brometo de tetrabutil amônio (BTBA, —), brometo de cetiltrimetil amônio (BCTA, —) Figura 11 e; por fim, o surfactante neutro triton X-100 (TX-100, —) Figura 12.

De acordo com as diferentes espécies de surfactantes testadas (Figura 10-12), verifica-se que todos promoveram uma mudança considerável no perfil voltamétrico das três FQs, principalmente com relação ao aumento da capacitância quando na presença dos surfactantes. Entretanto, não houve aumento de intensidade da corrente de pico considerável dos sinais provenientes de cada uma das espécies de FQ. Em uma análise simultânea, nem sempre a intensificação do sinal é o fator preponderante, uma vez que o aumento do sinal pode favorecer a sobreposição dos sinais. Portanto, para este estudo o principal fator avaliado na resposta voltamétrica foi a separação dos picos. Assim, na Figura 12 observa-se que o surfactante neutro Triton X-100, um leve deslocamento para potenciais

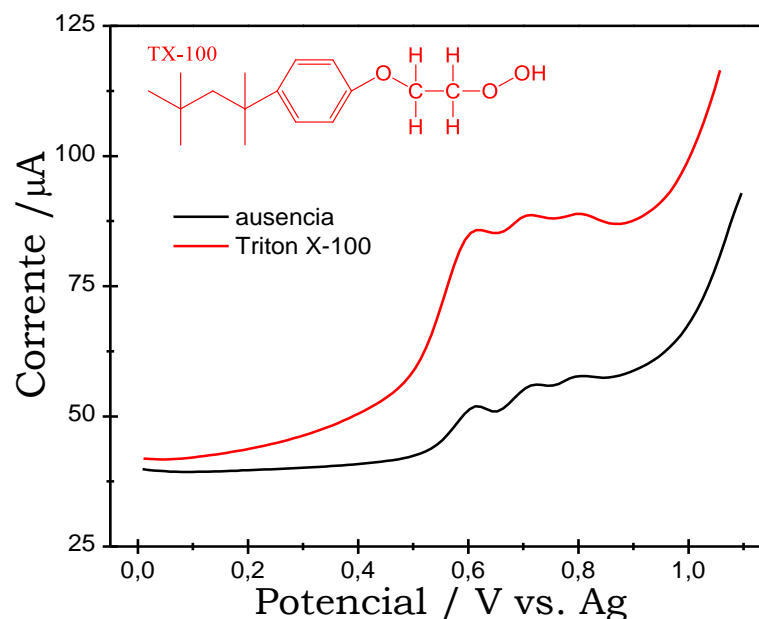
negativos e também foi o que melhor apresentou discriminação dos picos, e por fim este foi usado, na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  para os estudos subsequentes.



**Figura 10.** Voltamogramas de PD, registrados na presença dos surfactantes, concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ : LSS (—), DSS (—) e na ausência de surfactante (—). Condições: oxidação eletroquímica de LEVO, NOR e DANO  $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0),  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inserido: Estrutura química dos surfactantes aniônicos: LSS (—), DSS (—).



**Figura 11.** Voltamogramas de PD, registrado na presença dos surfactantes, concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ : CTEA (—), BTBA (—) e na ausência de surfactante (—). Condições: oxidação eletroquímica de LEVO, NOR e DANO  $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0),  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inserido: Estrutura química dos surfactantes catiônicos: CTEA (—), BTBA (—).

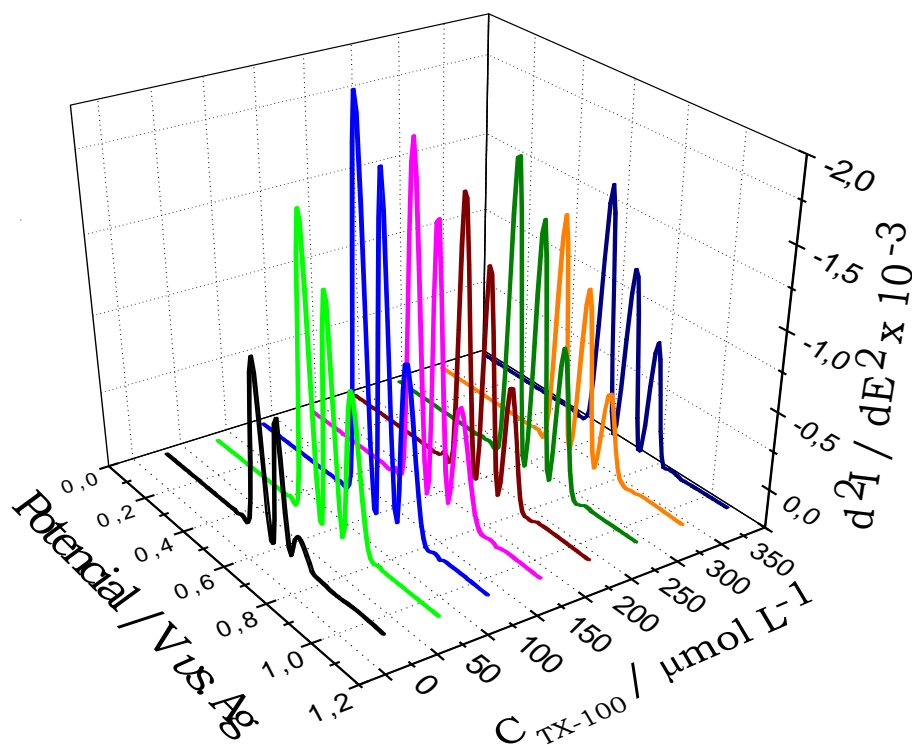


**Figura 12.** Voltamogramas de PD, registrados na presença do surfactante TX-100 (—), concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , e na ausência de surfactante (—). Condições: eletro-oxidação simultânea de  $18 \mu\text{mol L}^{-1}$  de LEVO, NOR e DANO no EI-NFC, em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0),  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inseto: Estrutura química do surfactante TX-100.

#### 4.6 Efeito da concentração do surfactante

Estudos revelam que abaixo da concentração micelar crítica (CMC) as interações entre as espécies presentes na solução são puramente eletrostática, enquanto que acima da CMC pode haver formação de aglomerados micelares e, isto afeta o coeficiente de difusão das espécies de interesse e dificulta a transferência eletrônica [9, 52]. Neste contexto, testou-se a influência da concentração, do surfactante TX-100 no intervalo de concentração entre  $50$  a  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Foi observado que em concentração acima de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  houve a diminuição da corrente de pico, um indicativo de formação de agregados micelares, afetando o coeficiente de difusão e o processo de transferência eletrônica [52]. Também foi observado o decaimento da intensidade de corrente, a partir da concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , um indicativo da formação de agregados micelares o que dificulta o processo de transferência eletrônica, provocado pelo aumento da concentração próximo a CMC [52]. Reunindo as informações obtidas, tanto para o estudo do tipo do surfactante (Figura 12)

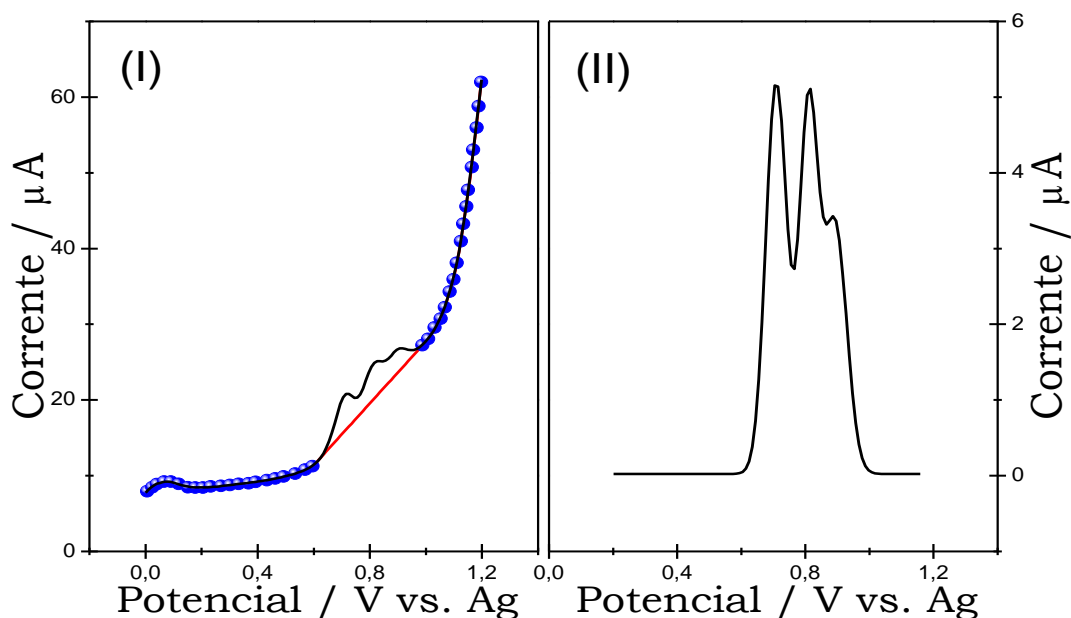
quanto para a melhor concentração, ainda não foi possível obter uma condição na qual houvesse a separação satisfatória dos picos. Assim, para demonstrar o estudo da concentração do surfactante TX-100, foi utilizado o procedimento matemático de segunda derivada aplicado na separação dos sinais, que será comentado na sequência (seção 4.7). De acordo com os voltamogramas derivados apresentados na Figura 13, a melhor resposta em termo de intensidade de corrente de pico foi obtida na concentração  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, a condição de maior separação bem como, melhor resolução,  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do surfactante TX-100, foi escolhida para conduzir os demais estudos, demonstrado na Figura 13 (—).



**Figura 13.** Voltamogramas de PD, com a aplicação da segunda derivada com a linha base corrigida, no estudo da concentração do surfactante TX-100 entre a concentração de  $50$  a  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para eletro-oxidação de LEVO, NOR e DANO em  $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sobre a superfície do EI-NF, em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0),  $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.7 Procedimentos matemáticos

Os parâmetros apresentados anteriormente, tais como: pH, tipo e concentração do surfactante, técnicas voltamétricas e seus respectivos parâmetros instrumentais não possibilitaram a completa separação e discriminação dos sinais. Nesta seção, serão apresentados alguns métodos matemáticos usados para melhorar a separação de sinais voltamétricos, principalmente, em situações de completa sobreposição de sinais, tais como: deconvolução, primeira e segunda derivada. Na Figura 14 é apresentado o VPD original (ausência de processo matemático), Figura 14I, e após a correção da linha base do voltamograma original (Figura 14II).

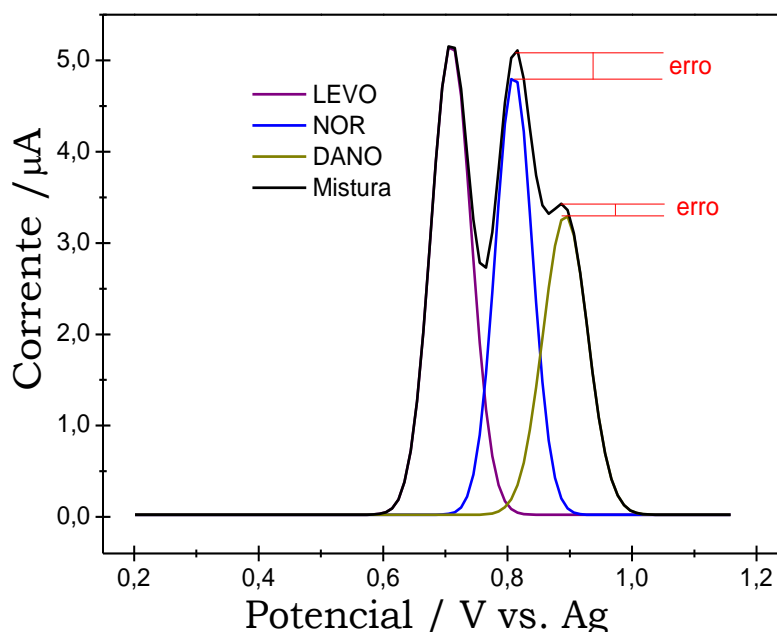


**Figura 14.** Voltamogramas de PD: original (I) e o original com a linha base corrigido (II) para a eletro-oxidação de  $18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  LEVO, NOR e DANO. Sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.

Obtido o voltamograma de PD, demonstrado na Figura 14 (I), realizou-se a correção da linha base (II), o qual foi aplicado o processo matemático de deconvolução, como verificado na Figura 15. Neste caso, pode ser observada a melhor discriminação com melhor precisão nos valores de potencias referente à oxidação de cada uma das espécies LEVO, NOR e DANO. A deconvolução apresenta um perfil muito interessante com picos bem



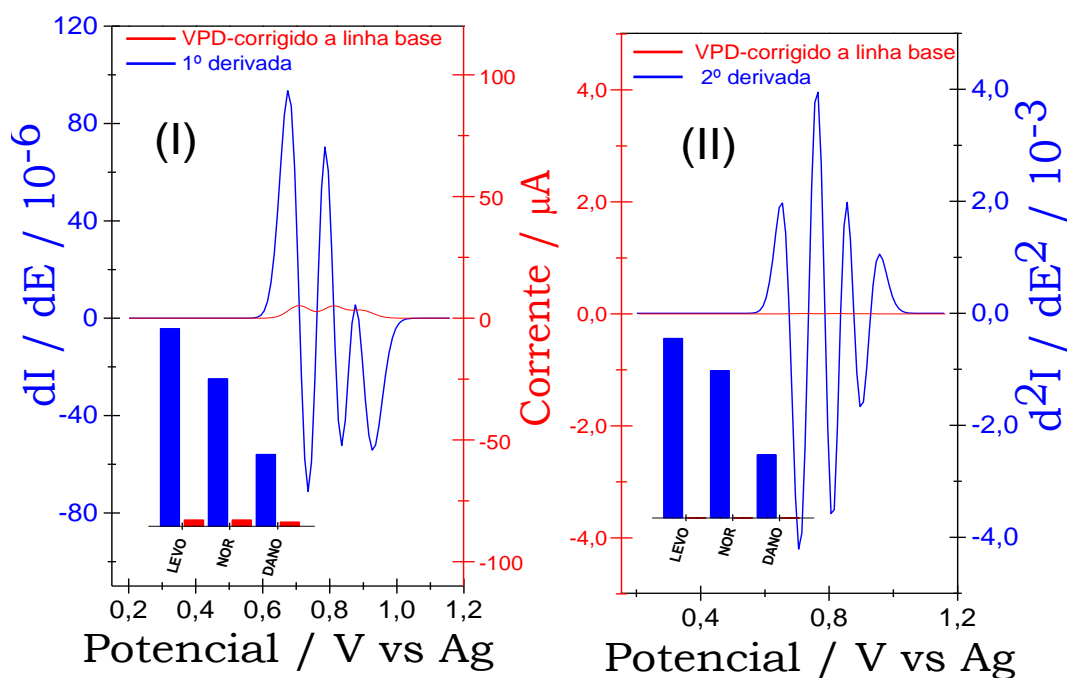
definidos, entretanto, a distância entre os potenciais de oxidação, LEVO, NOR e DANO, é de apenas 0,09 V, o que pode ocasionar problemas na obtenção dos valores de intensidade de sinal. Na Figura 15 é demonstrado, por meio da comparação do voltamograma original (—) com deconvoluido, a queda na intensidade de sinal, sendo para NOR 5,98 % (—) e para DANO 4,18 % (—). Como pode ser observado o processo matemático de deconvolução influencia, na precisão do resultado (barra de erro —) e nestas condições, tal método, não é uma alternativa viável. Sendo que, no desenvolvimento de um método para o monitoramento destas espécies, o controle e a precisão são fatores de extrema importância.



**Figura 15.** Voltamogramas de PD, original com a linha base corrigida (—), submetido ao processo matemático de deconvolução, sinal referente a eletro-oxidação LEVO (—), NOR (—) e DANO (—), de  $18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.

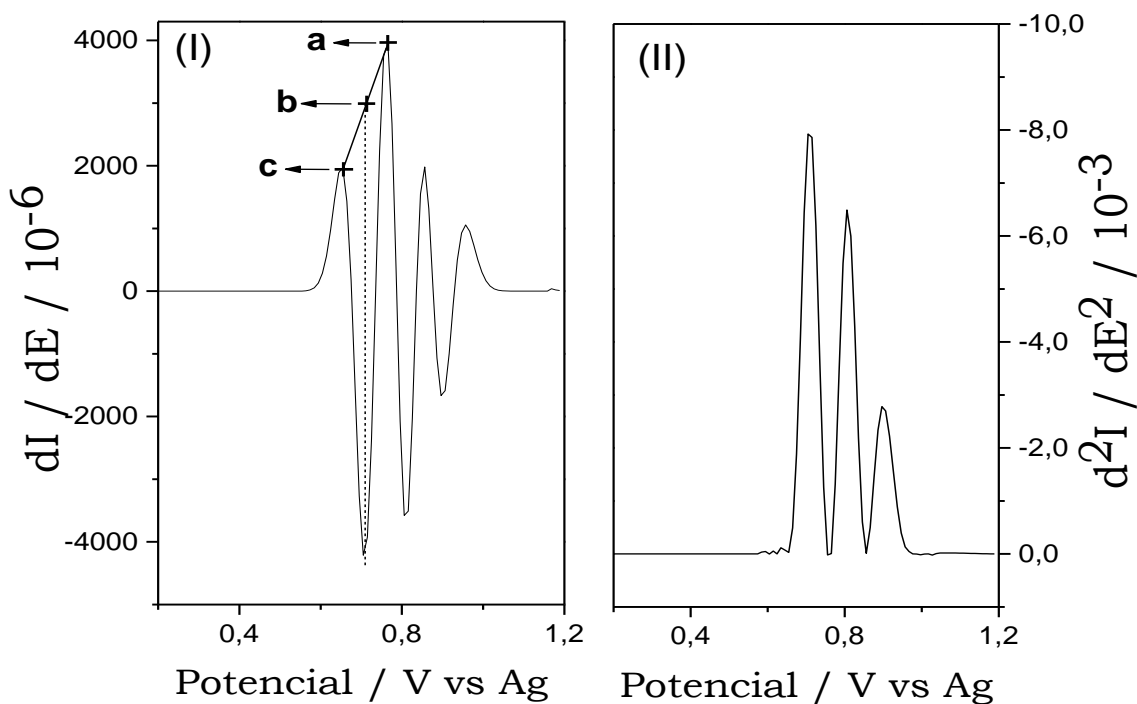
Para separação de sinais parcialmente sobrepostos, a primeira e a segunda derivada são alternativas mais bem sucedidas e seu uso tem sido difundido em diversos métodos de análise, entre os quais: espectrofotométricos <sup>[85, 86, 87]</sup>, condutométricos <sup>[88]</sup>, potenciométricos <sup>[88]</sup> e voltamétricos <sup>[89]</sup>. Um destes exemplos sucedidos, é o método desenvolvido por Garcia e coautores <sup>[89]</sup>, aplicado em amostras com altos níveis de espécies concomitantes com potencial interferente, como água e sedimentos, na determinação voltamétrica de platina.

Neste mesmo contexto, na Figura 16, é mostrado os voltamogramas (VPD) após a aplicação da primeira derivada (Figura 16I, voltamograma —) e a segunda derivada (Figura 16II, voltamograma —), ambos comparados com aqueles obtidos com apenas a correção da linha base (Figura 16, voltamograma —, I e II). Nitidamente, o sinal do voltamograma com apenas a correção da linha base não promoveu melhoria significativa, tanto na separação quanto na intensificação dos picos para as FQs. Por outro lado, com a aplicação da primeira e segunda derivada, verifica-se que houve amplificação dos picos para todas as espécies. Ademais, observa-se que houve um aumento para a primeira derivada da ordem de 32 (LEVO), 24 (NOR), 18 (DANO) vezes, e para a segunda derivada este aumento, foi ainda maior, da ordem de 1538 (LEVO), 1271 (NOR) e 813 (DANO) vezes. As proporções, destes valores, são melhores visualizadas no gráfico de barras inseridos na Figura 16 (para primeira derivada I e para a segunda derivada II).



**Figura 16.** Voltamogramas de PD, com a aplicação: (I) de apenas a correção da linha base, (—) correção da linha base juntamente com primeira derivada (—), (II) apenas a correção da linha base (—) e correção da linha base juntamente segunda derivada (—). Condições: 18,5 µmol L<sup>-1</sup> das FQs LEVO, NOR e DANO, sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>, com 100 µmol L<sup>-1</sup> de TX-100. Parâmetros da VPD otimizados: expressos na Tabela 2.

A escolha do modo de medida da corrente de pico também é fundamental para obtenção precisa e exata da intensidade de corrente de pico. Segundo Almécija e colaboradores [90], esta medida pode ser realizada de três modos: (a) no início do pico, (b) do início ao final do pico, e (c) no final do pico, como indicado na Figura 17I. Dentre estes métodos de medida de corrente, optou-se pela medida na qual inicia-se ao fim do pico (c), cujo processo tem sido comum nas medidas voltamétricas com correção de linha base. Entretanto, cabe ressaltar que, em todos os métodos de medida foi necessária a correção da linha base antes e após o processo. Portanto, na Figura 17II está apresentado o VPD com correção da linha base antes e após a aplicação da segunda derivada.



**Figure 17.** Voltamogramas de PD após a aplicação da segunda derivada: (I) mostrado as correções de linha base (a) no início do pico, (b) do início ao final do pico, e (c) e no final do pico. (II) Aplicação do método de correção de linha base do início ao final do pico e correção da linha. Para as FQs LEVO, NOR e DANO em  $18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  sobre a superfície do eletrodo de EI-NFC em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TX-100. Parâmetros da VPD: expressos na Tabela 2.

O processo matemático de segunda derivada com a linha base corrigida, Figura 17, permitiu distinguir claramente os três picos voltamétricos, levando a uma medida mais

precisa e exata da intensidade de corrente de pico bem como sua intensificação. Assim, este processo pode ser utilizado como um método mais eficaz para as medidas de corrente de pico, tanto para aumentar a resolução quanto a intensidade do sinal durante as análises, em que a concentração dos analitos encontram-se a níveis traço e o sinal é praticamente imensurável.

### **4.6 Limpeza do EI**

Os eletrodos impressos apresentam inúmeras vantagens como mencionado na seção 1.71. Entretanto, seu uso é limitado a poucas medidas devido a contaminação por incrustações de produtos eletrogerados sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Uma forma de contornar este problema é o uso de surfactantes, os quais permitem minimizar essas interferências. Outra possibilidade de minimizar o processo de contaminação da superfície e aumentar a vida útil dos EIs têm sido o uso de limpeza eletroquímica [47, 48]. Assim, neste trabalho, foi avaliado um procedimento de limpeza da superfície EI, como descrito na seção experimental 3.3, após as medidas na presença das FQs. Obtendo-se como parâmetro de avaliação, da eficiência do processo de limpeza, a precisão entre diferentes medidas para um mesmo eletrodo (repetibilidade) e diferentes eletrodos (reprodutibilidade). Após as medidas supracitadas, foram obtidos valores de desvios entre as medidas (repetibilidade e reprodutibilidade) inferiores a 10 %. Sendo para a repetibilidade de 5,7% (LEVO), 2,5% (NOR) e 0,3% (DANO) (5 eletrodos); e reprodutibilidade, de 8,9% (LEVO), 9,0% (NOR) e 5,1% (DANO). Portanto, o procedimento de limpeza permitiu reutilizar um EI, sem comprometer os resultados, e sendo muito mais viável do que utilizar uma nova superfície eletródica a cada medida.

### **4.8 Otimização das condições de trabalho e obtenção da curva analítica**

Na Tabela 3, estão reunidos os parâmetros instrumentais e experimentais e a aplicação de recursos matemáticos avaliados e otimizados deste trabalho.

**Tabela 3.** Parâmetros experimentais e instrumentais estudados e otimizados para detecção simultânea das FQs.

Técnicas	Tipo testado	Otimizados
Voltamétricas	VPD, VOQ e VVL	VPD
Condições instrumentais da VPD		
Parâmetros	Intervalo testado	Otimizados
$\Delta E_s$ / mV	1,0 – 10	4,0
$E_{sw}$ / mV	15 – 140	25
$\nu$ / mV s <sup>-1</sup>	2,0 – 20	10
Tempo de equilíbrio / s	0 – 30	5,0
Condições experimentais		
Parâmetros	Intervalo ou tipo testado	Otimizados
Eletrólito de suporte	Tampão fosfato e BR	BR
conc. estudada / mol L <sup>-1</sup>	0,04 – 0,12	0,04
pH do tampão	3,0 – 7,0	5,0
Surfactantes	LSS, DSS, BCTA, BTBA e TX-100	TX-100
Concentração de TX-100 / $\mu\text{mol L}^{-1}$	50 – 300	100
Método de separação de sinais		
Métodos matemáticos	Testado	Otimizado
Algoritmos	deconvolução, 1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> derivada	2 <sup>o</sup> derivada

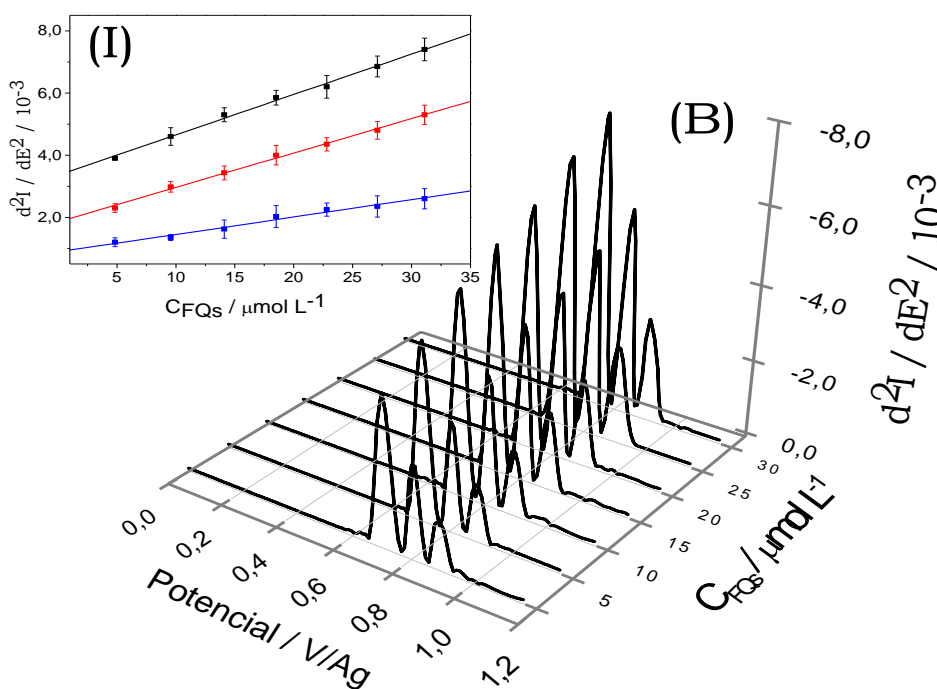
Após obtenção das melhores condições instrumentais e experimentais, bem como da escolha do método matemático de segunda derivada foi construída uma curva de calibração. Na Figura 18 (I) são apresentadas as curvas de calibração obtidas para as três FQs juntamente com os seus respectivos voltamogramas (II). O intervalo de linearidade para as espécies de interesse foi de 4,8 a 31  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Com os dados extraídos da curva (Tabela

4), foi calculado limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), usando equação 4 e 5, respectivamente. Nas equações, **SD** representa o desvio padrão do intercepto e **b** a inclinação da curva de calibração. Os valores de LD e LQ bem como os dados referentes a curva de calibração estão reunidos na Tabela 4.

$$\text{Limite de detecção} = 3 \times \frac{SD}{b} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Limite de quantificação} = 10 \times \frac{SD}{b} \quad \text{Equação 5}$$

De acordo com os valores de LD calculados para cada espécie, LEVO ( $LD_{LEVO} = 2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), NOR ( $LD_{NOR} = 1,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DANO ( $LD_{DANO} = 2,53 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), verifica-se que são altos e não atendem aos requisitos para a quantificação em níveis traço. Portanto, para detectar e quantificar estas FQs em menores concentrações será necessário o uso de uma etapa de pré-concentração durante a preparação da amostra.



**Figura 18.** (I) Voltamogramas de PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação simultânea de LEVO, NOR e DANO, na faixa de concentrações de 4,8 a 31  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sobre a superfície do EI-CNF. Inserção: (II) Curva de calibração, dependência da corrente de pico em função da concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 3.

**Tabela 4.** Parâmetros inerentes a curva de calibração, das três FQs.

Parâmetros	LEVO	NOR	DANO
Intervalo linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,8 – 31	4,8 – 31	4,8 – 31
Intercepto / $\mu\text{A}$	0,0034	0,002	0,0009
Inclinação / $\mu\text{A L } \mu\text{mol L}^{-1}$	130,6	112,0	55,6
Coeficiente de correlação	0,995	0,999	0,997
LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,40	1,32	2,53

#### 4.9 Preparo da amostra via microextração líquido-líquido

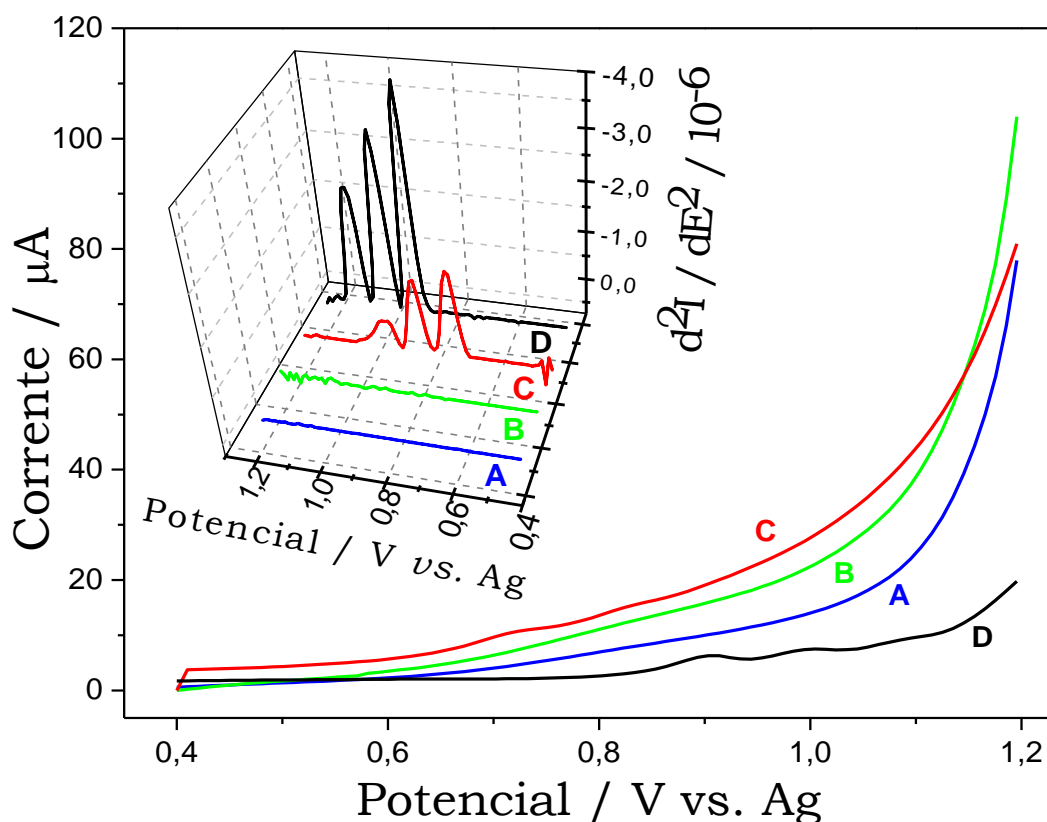
Em amostras complexas, é imprescindível a etapa de preparo de amostra, devido ao fato de que a interferência de outras espécies pode afetar diretamente no sinal do analito de interesse e, conseqüentemente na determinação do mesmo. Outro ponto que deve ser levado em consideração, quando trata-se de preparo de amostras, é a etapa de pré-concentração, empregada em diversas técnicas analíticas. No que se trata das técnicas eletroquímicas, é comum o uso da etapa de pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo de trabalho, antes da etapa de medida. Na maioria das vezes a pré-concentração eletroquímica tem sido realizada mediante a aplicação de um potencial em função de um tempo preestabelecido e, neste caso, não há qualquer preparo prévio da amostra. Neste procedimento, diversas vantagens têm sido observadas, tais como rapidez, simplicidade, baixo custo e, em alguns casos, a detecção seletiva de certas espécies químicas. Entretanto, o uso da pré-concentração eletroquímica pode “acelerar” o processo de envenenamento da superfície eletródica pela adsorção irreversível de mais espécies na

superfície do eletrodo, podendo assim inativá-la [91, 92]. Neste sentido, o tratamento da amostra é fundamental para reduzir/eliminar alguns dos constituintes da matriz e diminuir o seu efeito delas na detecção seletiva dos analitos de interesse. Outro ponto interessante no preparo de amostras é o ajuste do volume final a ser analisado, o qual é fundamental para assegurar um alto fator de pré-concentração (enriquecimento) e, assim, atingir os requisitos para análises em níveis de traços.

Neste contexto, foi realizado um estudo comparativo entre medidas empregando a pré-concentração eletroquímica e a MELL-SBD-AU. Na Figura 19, são mostrados os voltamogramas originais registrados para as amostras de água da torneira (após ajuste do pH a 7,0) na ausência das FQs (voltamograma **A**). Em seguida enriqueceu-se a amostra de água da torneira, com  $8,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cada uma das FQs e realizou-se a medida voltamétrica para detecção direta, sem qualquer etapa de pré-concentração (voltamograma **B**). Na sequência, foi realizada a medida com pré-concentração eletroquímica aplicando-se 0,4 V durante 400 s (voltamograma **C**) e comparou-se com a pré-concentração usando o método MELL-SBD-AU (voltamograma **D**), ambos na presença das espécies de interesse. Na mesma figura (inserção Figura 19), foram comparadas todas as medidas realizadas, neste caso, com os voltamogramas após a aplicação da segunda derivada com a linha base corrigida. O voltamograma derivado, branco (ausência etapa de pré-concentração, Figura 19A) não foi observado nenhum pico referente a algum processo faradaico. Isto indica que na faixa de potencial avaliada, o eletrodo e os componentes da matriz da amostra não são eletroativos, o que viabiliza a quantificação das FQs neste meio empregando este eletrodo de trabalho. Similarmente, na Figura 19B é observado que a amostra de água enriquecida com as FQs, na concentração de  $8,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, não apresenta picos decorrentes da oxidação. Evidência de que o EI utilizado não apresenta sensibilidade suficiente para mediar as reações de oxidação das espécies nesta concentração. Confirmando assim, que há necessidade de uma etapa de pré-concentração anterior a etapa de medida para melhorar a detectabilidade das análises.



Por fim, com a aplicação dos métodos de pré-concentração eletroquímica (Figura 19C) e pré-concentração via MELL-SBD-AU (Figura 19D), é possível detectar satisfatoriamente as três FQs. No entanto, a medida empregando a pré-concentração via MELL-SBD-AU (Figura 19D) possibilitou a obtenção de picos mais intensos, quando comparada à medida realizada com a pré-concentração eletroquímica. Portanto, o método MELL-SBD-AU foi escolhido para conduzir os estudos subsequentes.



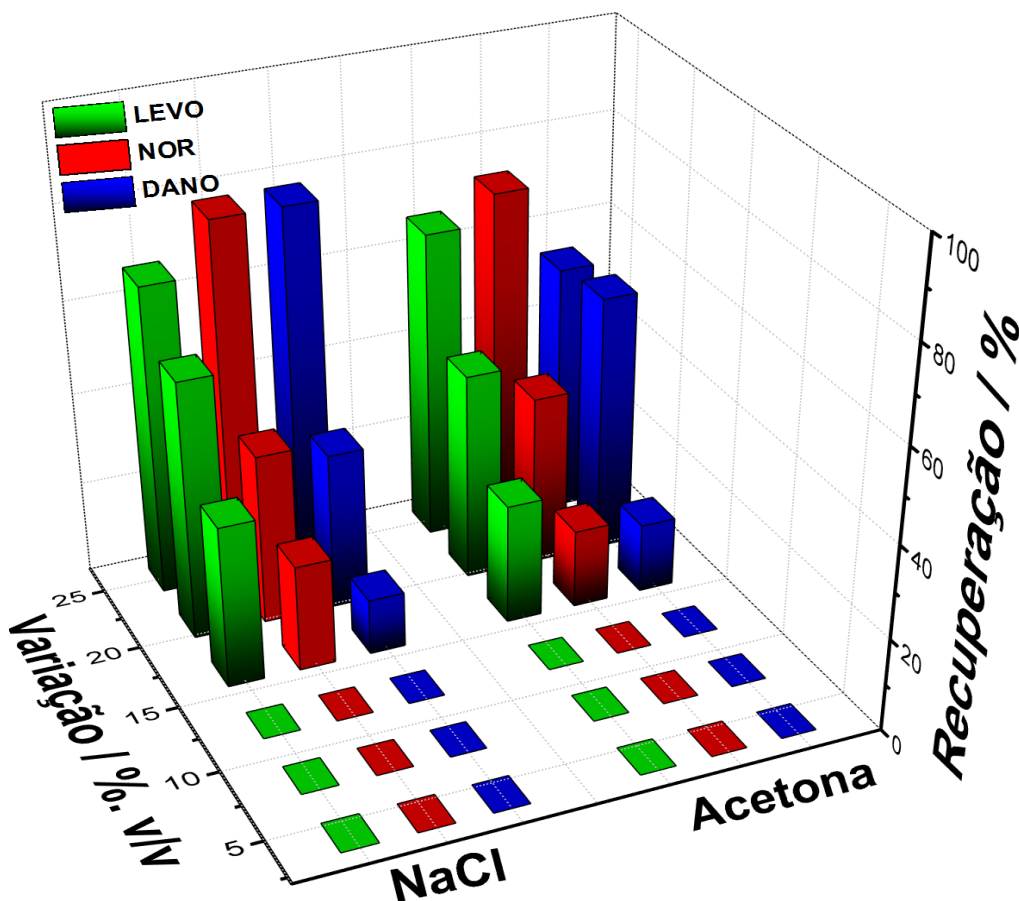
**Figura 19.** (I) Voltamogramas de DP, (II) inserção dos voltamogramas derivados com as linhas bases corrigidas: (A) Branco em solução de tampão BR preparadas em amostra de água da torneira na ausência das FQs, (B) detecção direta em amostra de água da torneira sem qualquer etapa de pré-concentração, (C) detecção utilizando a pré-concentração eletroquímica em 0,4 V a 400 s e (D) pré-concentração via MELL-SBD-AU. B, C e D registrado para eletro-oxidação de LEVO, NOR e DANO em concentração de  $8,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Utilizando as condições experimentais e instrumentais da Tabela 3.

### 4.11 Otimização da MELL-SBD-AU

O procedimento de extração e pré-concentração via MELL-SBD-AU, aplicado anteriormente, é uma estratégia adequada que permite a quantificação em baixos limites de concentração, em amostras altamente diluídas. Geralmente, os parâmetros estudados no desenvolvimento de métodos de microextração convencional (MELL) são: o tipo e volume de solvente extrator, força iônica (pela adição de sal), pH da amostra, temperatura, centrifugação, ultrassonificação e agitação mecânica [93, 94, 95, 96]. Metodologias adaptadas de MELL convencional foram anteriormente publicadas para determinação de diferentes analitos orgânicos e inorgânicos [95, 96, 97, 98]. Nas adaptações, foram consideradas a diminuição de etapas experimentais, a redução do uso de solventes ou uso solventes de baixa toxicidade, a rapidez e os custos, todos fatores que são decisivos para viabilizar o uso desses métodos em análises eletroquímicas. Outro ponto importante, que deve ser levado em consideração na escolha dos parâmetros, é o uso de solvente extrator volátil e menos tóxico, comparado a aqueles usados em MELL convencional. Neste sentido, o sistema de extração e pré-concentração via MELL-SBD-AU foi adaptado para atender a todos os requisitos supracitados. Após a realização das etapas de microextração, objetivou-se por processos nos quais pequenos volumes pudessem ser depositados diretamente na superfície do EI-NFC.

Os estudos dos parâmetros iniciais referente a etapa de microextração foram: variação da fase orgânica (acetona) e da força iônica (adição de NaCl), variando simultaneamente ambas entre a faixa de 4,0 a 25,0%. Para a variação, tanto de NaCl quanto de acetona, os valores abaixo de 15% não forneceram resultados satisfatórios (Figura 20), pois não houve formação da fase orgânica extratora. A partir de 15%, de ambas as variáveis, ocorre a formação da fase orgânica (fase com menor densidade) que possibilitou medir satisfatoriamente os valores de recuperação de cada analito. Entretanto, os melhores valores de recuperação são observados em porcentagens de 25% de acetona e NaCl, cujo efeito pode ser associado ao aumento do efeito “salting-out”, que auxilia na obtenção de um maior volume da fase orgânica extratora. Acima de 25% não foi observado

nenhum efeito satisfatório, em relação ao aumento da recuperação, que pode ser justificado pela ocorrência da migração de sal da fase aquosa para a fase orgânica e, que pode ter acarretado na mudança da força iônica da solução. Assim, escolheu a porcentagem de 25% como ideal para acetona e NaCl, condição na qual forneceu valores de recuperação entre 67 e 80%.



**Figura 20.** Valores de recuperação das FQs, em amostras de água da torneira, obtido variando a força iônica (variação de NaCl) e a fase extratora (acetona), para o procedimento de MELL-SBD-AU. Condições: instrumentais e experimentais, volume da amostra = 12 mL, pH da amostra = 10, tempo de agitação via vortex = 15 min, tempo de ultrassonificação = 5 min e tempo de centrifugação = 5 min, condições apresentadas na Tabela 4.

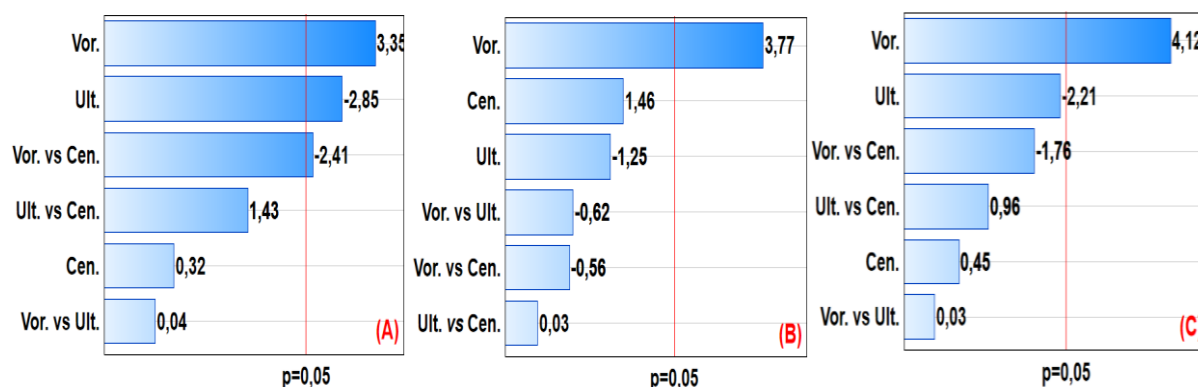
Os parâmetros: agitação via vortex, ultrassonificação e centrifugação, podem influenciar de forma decisiva no fator de enriquecimento da amostra [76, 93, 94, 95, 96, 97, 98]. Desta forma, estes parâmetros foram estudados visando sempre o menor tempo requerido, com

objetivo de reduzir o número de ensaios. Para tal, uma forma rápida e menos dispendiosa foi análise após um planejamento fatorial  $2^3$  (descrito na seção 3,6), avaliando a recuperação das espécies. Os resultados obtidos para o planejamento estão apresentados na Tabela 5 e foram interpretados pelo diagrama de Pareto, Figura 21.

A análise do diagrama de Pareto indica que o tempo de extração para a etapa de centrifugação não foi significativa. Entretanto, para o tempo de agitação (via vortex) obteve-se valores positivos (3,35, 3,77 e 4,12), como consequência, do ponto máximo aplicado para o tempo de agitação via vortex (15 min.). Proporcionou maior interação entre as fases (aquosa e orgânica) facilitando na migração das FQs para a fase orgânica. A etapa de ultrassonificação também influenciou significativamente nos valores de recuperação, entretanto, negativamente (-2,85, -1,25 e -2,21). Isto, pode ser justificado pelo fato de que o tempo máximo (15 min.) de exposição sob as ondas ultrassônicas, mesmo em baixas frequências, pode levar a degradação das FQs e afetar o rendimento da extração [99, 100]. Portanto, de acordo com o diagrama de Pareto, os parâmetros de maior influência, em termos de extração, foram no ponto mínimo (5 min.) para o ultrassom e valores no ponto máximo (15 min.) para o vortex, os quais foram aplicados na matriz Doehlert.

**Tabela 5.** Otimização quimiométrica do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> aplicado para o MELL-SBD-AU.

Ensaio	Fatores			Níveis		
	Vortex / min.	Ultrassom / min.	Centrifugação / min.	Baixo ( - )	Alto ( + )	
				5	5	15
Ensaio	Parâmetros e variação			Teste de recuperação / %		
	Vortex	Ultrassom	Centrifugação	LEVO	NOR	DANO
1	-1	-1	-1	49	56	62
2	1	-1	-1	69	65	87
3	-1	1	-1	8	40	53
4	1	1	-1	63	61	69
5	-1	-1	1	57	57	63
6	1	-1	1	72	72	77
7	-1	1	1	51	71	71
8	1	1	1	40	61	64
9	-1	-1	-1	53	53	67
10	1	-1	-1	93	73	83
11	-1	1	-1	25	53	54
12	1	1	-1	54	72	78
13	-1	-1	1	57	57	75
14	1	-1	1	53	83	76
15	-1	1	1	49	49	57
16	1	1	1	69	69	82



**Figura 21.** Diagrama de Pareto obtido para o planejamento fatorial  $2^3$ , (A) LEVO, (B) NOR e (C) DANO. Vor. = vortex; Cen. = centrifugação; Ult. = Ultrassonificação.

Resumindo, a eficiência de extração é observada sobre as superfícies de resposta, Figura 22, para as condições otimizadas do método MELL-SBD-AU, que estão reunidas na Tabela 6. As superfícies de respostas foram obtidas pela matriz Doehlert, cujas respostas, sobre os valores aplicados estão apresentadas na Tabela 7. Por fim, o método foi validado por análise de variância (ANOVA), onde o teste de Fisher indicou que o modelo de regressão quadrática é significante, empregando a relação entre  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ . Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  encontrados foram: 7,17 (LEVO), 2,75 (NOR) e 1,78 (DANO), todos inferiores ao valor tabelado que é de 18,51, apresentados na Tabela 8. Portanto, a taxa de erro a um nível de confiança de 95% demonstra que o método é significante.

## Resultado e Discussão

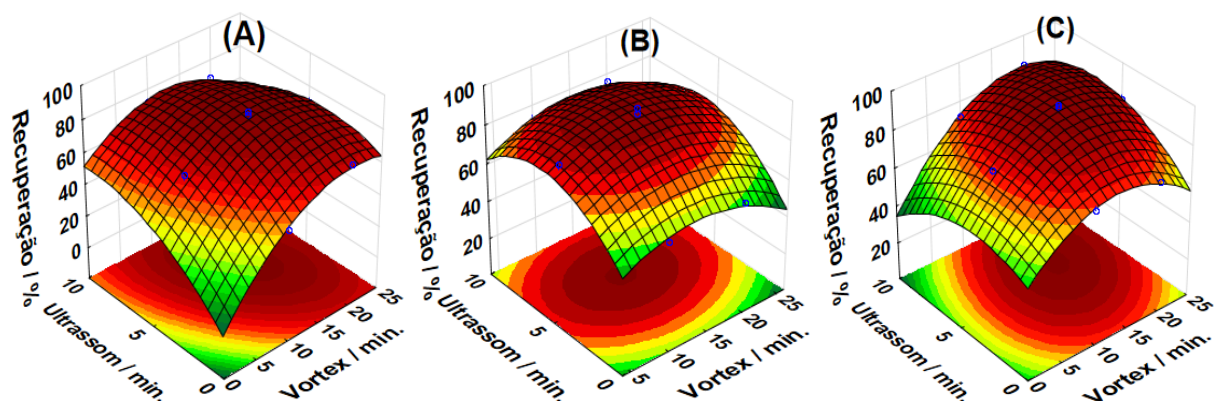
**Tabela 6.** Parâmetros estudados na etapa de otimização do procedimento de LDS-UA-LLME, juntamente com as condições otimizadas.

Parâmetros	Tipo e / ou intervalo testado	Otimizado
Solvente de baixa densidade	Acetona, 1-octanol, acetonitrila	Acetona
Sal	NaCl, LiCl, MgCl, MgSO <sub>4</sub> ,	NaCl
Quantidade de sal / %	4,2 - 35	25
Volume do extrator / %	4,2 – 25	25
Tempo do Vortex / min.	5 e 15	15
Tempo de ultrassonificação / min.	5 e 15	5
Tempo de centrifugação / min.	5 e 15	5

**Tabela 7.** Parâmetros e valores aplicados para a obtenção da matriz Doehlert.

Ensaio	Parâmetros e variação		Teste de recuperação / %		
	Vortex <sup>[a]</sup>	Ultrassom <sup>[b]</sup>	LEVO	NOR	DANO
1	1 <sup>[a]</sup>	0	70	75	81
2	0,5	0,866	69	76	85
3	-1	0	64	82	75
4	-0,5	-0,866	49	58	71
5	0,5	-0,866	68	59	69
6	-0,5	0,866	72	71	72
7	0	0	83	93	90
8	0	0	81	86	93
9	0	0	80	90	92

Valores codificados para o tempo na etapa de agitação: <sup>[a]</sup> via vortex, onde: 1 = 25; 0,5 = 20; 0 = 15; -0,5=10; -1 = 5 em minutos. <sup>[b]</sup> via ultrassonificação onde: 0,866 = 10; 0 = 5; -0,866 = 0 em minutos.



**Figura 22.** Superfície de resposta para LEVO (A), NOR (B) e DANO (C).

**Tabela 8.** Informações sobre o processamento de análise de variância (ANOVA) avaliada para verificar a importância do modelo de regressão quadrática.

	FQs		LEVO	NOR	DANO
	GL	F <sub>Tabelado</sub>	F <sub>calculado</sub>	F <sub>calculado</sub>	F <sub>calculado</sub>
MQ <sub>R</sub> / MQ <sub>r</sub>	F <sub>5,3</sub>	9,01	23,44	13,51	48,50
MQ <sub>FAj</sub> / MQ <sub>PE</sub>	F <sub>1,2</sub>	18,51	7,17	2,75	1,79

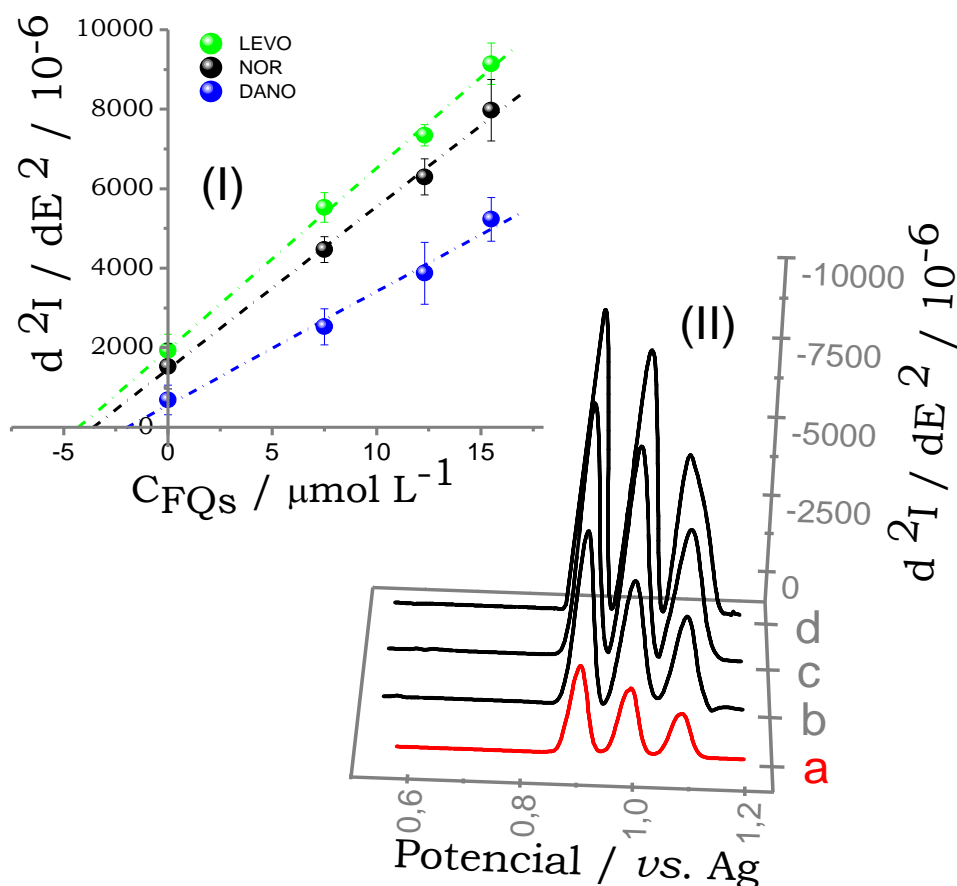
MQ = Média Quadrática; R = Regressão; r = resíduo; FAj = Falta de ajuste; EP = Erro puro.

#### 4.12 Desempenho do método

Após a otimização das condições de trabalho apresentada na Tabela 8, avaliou-se a resposta voltamétrica em função da porcentagem de recuperação de LEVO NOR e DANO em amostras de água da torneira enriquecidas com quantidade conhecida de FQs. Na Figura 23 é mostrada a curva de adição de padrão (Figura 23I) e os respectivos voltamogramas derivados com as linhas bases corrigidas (Figura 23II), obtidos com o método de MELL-SBD-AU sobre adição da gota (volume de 35  $\mu$ L de solução a cada medida) diretamente sobre a superfície do EI-NFC. As curvas de adição de padrão, bem como os respectivos voltamogramas, mostram que não há nenhum efeito matriz que comprometa a determinação simultânea das três FQs, mostrando a importância da etapa de



pré-tratamento. Nas demais adições do padrão (b-d), observa-se o aumento da corrente, com boa linearidade, e com coeficiente de correlação sempre próximo de 0,998.



**Figura 23.** (I) voltamogramas de PD, com aplicação da segunda derivada com a linha base corrigida para: (a (—)) 30  $\mu\text{L}$  de amostra de água contendo 30, 26 e 29  $\mu\text{g L}^{-1}$  de LEVO, NOR e DANO, (b-d (---)) adições sucessivas de 30  $\mu\text{L}$  de FQs (0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). (II) Curva de adição do padrão. Condição: experimental e instrumental, otimizadas apresentadas nas Tabelas 3 e 8.

Enfim, os resultados obtidos após aplicação do método proposto associando o procedimento MELL-SBD-AU a eletroanálise e o processamento matemático forneceram resultados coerente ao esperado (Tabela 9). Na Tabela 9, estão apresentados valores de recuperação em três valores de pH 2,0, 6,7 e 10,0 e para dois níveis de concentrações de 8,3  $\text{nmol L}^{-1}$  e de 83  $\text{nmol L}^{-1}$ .

**Tabela 9.** Resultados obtidos para adição e recuperação das FQs, LEVO, NOR e DANO em amostras de água da torneira.

FQs	pH da Amostra	Adicionado	Encontrado <sup>[a]</sup> / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado	CV / %
LEVO	2,0	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,4	34,7%	5,8
	6,7		24,7	82,3%	6,9
	10		29,6	98,8%	8,4
NOR	2,0	26 $\mu\text{g L}^{-1}$	14,4	55,3%	4,2
	6,7		23,0	88,0%	7,8
	10		24,5	94,3%	5,0
DANO	2,0	29 $\mu\text{g L}^{-1}$	16,0	55,0%	6,4
	6,7		20,0	69,0%	12,7
	10		28,0	96,5%	13,9
LEVO	10	3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,60	86,8	11,0
NOR	10	2,60 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,10	80,8	11,9
DANO	10	2,90 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,23	77,0	10,5

<sup>[a]</sup> Média de quatro determinações, CV = coeficiente de variação. Os valores: 3,0, 2,6 e 2,9  $\text{mg L}^{-1}$  e 30, 26 e 29  $\text{mg L}^{-1}$  representa, 8,3  $\text{nmol L}^{-1}$  e 83  $\text{nmol L}^{-1}$  de LEVO, NOR e DANO.

Verifica-se que o pH influencia no processo de extração de forma significativa e, conseqüentemente, nos valores de recuperação. A maior influência ocorre em baixos valores de pH, em que a fase aquosa diminuiu a migração das espécies para a fase orgânica. Em pH 10 (condição em que as espécies se encontram desprotonadas) foi a condição que propiciou a maior interação das FQs com a fase orgânica e, conseqüentemente, obteve-se valores de recuperação próximos aos esperados para análises a níveis de traços. Os valores de precisão e exatidão do método estão de acordo

com a equação de Horwtiz <sup>[101]</sup>, com desvios padrão sempre menores que 14%, indicando que o método é eficiente e é uma alternativa promissora para a detecção simultâneas dessas FQs.

## 5.0 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi mostrado que a detecção e a quantificação de espécies eletroquímicas com potenciais de pico próximos, diferenças inferiores a 160 mV, não é trivial. Entretanto, as estratégias matemáticas utilizadas possibilitaram a detecção simultânea, com destaque especial para a aplicação da segunda derivada com a correção da linha base, de espécies que apresentam potenciais de picos próximos. Este processo permitiu, não só a separação dos sinais, como também possibilitou a magnificação dos sinais das três FQs analisadas. Outro ponto importante foi a análise residual, o sistema de microextração via MELL-SBD-AU foi capaz de pré-concentrar as FQs a níveis detectáveis de forma mais efetiva que o método eletroquímico de pré-concentração. Destaca-se ainda que, o uso do solvente extrator de baixa densidade (acetona), permitiu enriquecer as amostras e possibilitou posteriormente a redissolução em alíquotas de 30  $\mu$ L diretamente sobre a superfície do eletrodo, pelo método de droplet-based, aumentando ainda mais a capacidade de pré-concentração. Por fim, tais condições possibilitaram a detecção e quantificação com precisão e exatidão aceitáveis, pelo emprego de análise quantitativa de resíduos das FQs LEVO, NOR e DANO em amostras de água da torneira, com recuperações próximas a 100%.

## 6.0 REFERÊNCIAS

1. SILVA, C. G. A. D.; COLLINS, C. H., Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes, **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011.
2. BELISÁRIO, M.; BORGES, P. S.; GALAZZI, R. M.; DEL PIERO, P. B.; ZORZAL, P. B.; RIBEIRO, A. V. F. N.; RIBEIRO, J. N., O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes, **InterSciencePlace**, v. 1, p. 1-10, 2015.
3. GROSTEIN, M. D., **Ciência Ambiental Questões e Abordagem**, São Paulo, 2008, p. 43-90.
4. SCHWARZENBACH, R. P.; EGLI, T.; HOFSTETTER, T. B.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B., Global water pollution and human health, **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 109-136, 2010.
5. HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L., **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment**, Science of the Total Environment, v. 225, p. 109-118, 1999.
6. BOXALL, A. B.; FOGG, L.; BLACKWELL, P.; BLACKWELL, P.; KAY, P.; PEMBERTON, E.; CROXFORD, A., **Veterinary medicines in the environment**, Reviews of environmental contamination and toxicology, Springer, 2004, p 1-34.
7. KÜMMERER, K., Antibiotics in the aquatic environment a review part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2009.
8. PEREIRA, F. O. G. **Análise voltamétrica da ciprofloxacina–aplicação a medicamentos e a remediação**. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2009, p. 11-12.
9. TRINDADE, M., **Estudo do Comportamento eletroquímico e determinação da moxifloxacina através de técnicas voltamétricas**, Campo Grande - MS, Programa de Pós-Graduação em Química - UFMS, Dissertação de Mestrado, 2005, p. 1-8.
10. APPELBAUM, P.; HUNTER, P., The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives, **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, p. 5-15, 2000.
11. BRYSKIER, A.; CHANTOT, J. F., Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones, **Drugs**, v. 49, v. 16-28, 1995.
12. NABER, K. G., Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, p. 331-341, 2001.
13. ZHANEL, G. G.; WALKTY, A.; VERCAIGNE, L.; KARLOWSKY, J. A.; EMBIL, J.; GIN, A. S.; HOBAN, D. J., The new fluoroquinolones: a critical review, **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 10, p. 207-238, 1999.

14. TAKEMURA, M.; HAYAKAWA, I., Recent advances in the field of quinolones, **Farmaco**, v. 56, p. 37-40, 2001.
15. SOUZA, C. D., **Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2008, p. 29-32.
16. HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S., The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans, **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, p. 716-721, 1985.
17. LAPARA, T. M.; MADSON, M.; BORCHARDT, S.; LANG, K. S.; JOHNSON, T. J., Multiple discharges of treated municipal wastewater have a small effect on the quantities of numerous antibiotic resistance determinants in the upper Mississippi river, **Environmental science & technology**, v. 49, p. 11509-11515, 2015.
18. MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B., Food animals and antimicrobials: impacts on human health, **Clinical microbiology reviews**, v. 24, p. 718-733, 2011.
19. BISACCHI, G. S.; MANCHESTER, J. I., A new-class antibacterial almost. Lessons in drug discovery and development: A critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV, **ACS Infectious Diseases**, v. 1, p. 4-41, 2014.
20. BISACCHI, G. S., Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story" Miniperspective, **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, p. 4874-4882, 2015.
21. RUTGERSSON, C.; FICK, J.; MARATHE, N.; KRISTIANSOON, E.; JANZON, A.; ANGELIN, M.; JOHANSSON, A.; SHOUCHE, Y.; FLACH, C. F.; LARSSON, D. J., Fluoroquinolones and qnr genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges, **Environmental science & technology**, v. 48, p. 7825-7832, 2014.
22. PETROVIC, M., Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples, **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 1, p. 25-33, 2014.
23. LI, X.; XIE, Y.; WANG, J.; CHRISTAKOS, G.; SI, J.; ZHAO, H.; DING, Y.; LI, J., Influence of planting patterns on fluoroquinolone residues in the soil of an intensive vegetable cultivation area in northern China, **Science of the Total Environment**, v. 458, p. 63-69, 2013.
24. XIE, Y. F.; LI, X. W.; WANG, J. F.; CHRISTAKOS, G.; HU, M. G.; AN, L. H.; LI, F. S., Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China, **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 126-131, 2012.

25. ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H., Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China, **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1069-1075, 2010.
26. ZOU, S.; XU, W.; ZHANG, R.; TANG, J.; CHEN, Y.; ZHANG, G., Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: impacts of river discharge and aquaculture activities, **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2913-2920, 2011.
27. GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; GIGER, W., Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, **Environmental science & technology**, v. 36, p. 3645-3651, 2002.
28. ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, K. I.; KAWAHARA, R., Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment, **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 508-514, 2013.
29. LILLENBERG, M.; YURCHENKO, S.; KIPPER, K.; HERODES, K.; PIHL, V.; LÖHMUS, R.; IVASK, M.; KUU, A.; KUTTI, S.; LITVIN, S., Presence of fluoroquinolones and sulfonamides in urban sewage sludge and their degradation as a result of composting, **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 7, 307-312, 2010.
30. DONE, H. Y.; HALDEN, R. U., Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States, **Journal of hazardous materials**, v. 282, p. 10-17, 2015.
31. CUNHA, B. A., Antibiotic side effects, **Medical Clinics of North America**, v. 85, p. 149-185, 2001.
32. BARTLETT, J. G.; BREIMAN, R. F.; MANDELL, L. A.; FILE, T. M., Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management, **Clinical infectious diseases**, v. 26, p. 811-838, 1998.
33. ETMINAN, M.; FOROOGHIAN, F.; BROPHY, J. M.; BIRD, S. T.; MABERLEY, D., Oral fluoroquinolones and the risk of retinal detachment. **JAMA**, v. 307, p. 1414-1419, 2012.
34. PANAS, M.; KARADIMA, G.; KALFAKIS, N.; VASSILOPOULOS, D., Hereditary neuropathy unmasked by levofloxacin, **Annals of Pharmacotherapy**, v. 45, p. 1312-1313, 2011.
35. **The United States Pharmacopeia XXI e NF 16**, US Pharmacopeial Convention, MD, p.219, 220, 705, 706, 1985.
36. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 12.
37. **The British Pharmacopoeia**, vol I e II, Her Majesty's Stationery Office, London, p.382, 741, 971, 1988.

38. PETERS, R. J. B.; BOLCK, Y. J. C.; RUTGERS, P.; STOLKER, A. A. M.; NIELEN, M. W. F., Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8206-8216, 2009.
39. PAWLISZYN, J., Sample preparation: quo vadis?, **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.
40. OSTERYOUNG, J.; ODEA, J., Square-wave voltammetry, **Electroanalytical chemistry**, v. 14, p. 209-308, 1986.
41. DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos, **Química Nova**, 26, 81-89, 2003.
42. NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L., Eletrodos fabricados por "silk-screen", **Química Nova**, v. 21, p. 614-629, 1998.
43. TRINDADE, M. A. G.; ZANONI, M. V. B., Voltammetric sensing of the fuel dye marker Solvent Blue 14 by screen-printed electrodes, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, p. 257-263, 2009.
44. JUNG, Y.; PARK, H.; PARK, J.-A.; NOH, J.; CHOI, Y.; JUNG, M.; JUNG, K.; PYO, M.; CHEN, K.; JAVEY, A., Fully printed flexible and disposable wireless cyclic voltammetry tag, **Scientific reports**, v. 5, p. 8105-8111, 2015.
45. SAMARANAYAKE, S.; ABDALLA, A.; ROBKE, R.; NIJHOUT, H. F.; REED, M. C.; BEST, J.; HASHEMI, P., A voltammetric and mathematical analysis of histaminergic modulation of serotonin in the mouse hypothalamus, **Journal of neurochemistry**, v. 138, p. 374-383, 2016.
46. HOFFMAN, A. F.; SPIVAK, C. E.; LUPICA, C. R., Enhanced dopamine release by dopamine transport inhibitors described by a restricted diffusion model and fast-scan cyclic voltammetry, **ACS chemical neuroscience**, v. 7, p. 700-709, 2016.
47. SUSMEL, S.; GUILBAULT, G.; O'SULLIVAN, C., Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 881-889, 2003.
48. CHUANUWATANAKUL, S.; DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; MOTOMIZU, S., Determination of trace heavy metals by sequential injection-anodic stripping voltammetry using bismuth film screen-printed printed carbon electrode, **Analytical Sciences**, v. 24, p. 589-594, 2008.
49. HOYER, B.; JENSEN, N., Suppression of surfactant interferences in anodic stripping voltammetry by sodium dodecyl sulfate, **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 759-764, 2003.
50. HOYER, B.; JENSEN, N., Stabilization of the voltammetric serotonin signal by surfactants, **Electrochemistry communications**, v. 8, p. 323-328, 2006.



51. HOYER, B.; JENSEN, N., Suppression of protein interferences in anodic stripping voltammetry by sodium dodecyl sulphate, **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 257-261, 2003.
52. HOYER, B.; JENSEN, N., Stabilization of the voltammetric response of organic analytes with self-passivating electrode reactions: Synergistic effect of surfactants and high buffer strength, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, p. 153-160, 2007.
53. JARA-ULLOA, P.; NÚÑEZ-VERGARA, L. E. J.; SQUELLA, J. E., Micellar effects on the reduction of 4-nitroimidazole derivative: detection and quantification of the nitroradical anion, **Electroanalysis**, v. 19, p. 1490-1495, 2007.
54. AVRANAS, A.; RETTER, U.; MALASIDOU, E., The adsorption and condensed film formation of cetyltrimethylammonium bromide at the mercury/electrolyte interface, **Journal of colloid and interface science**, v. 248, p. 347-354, 2002.
55. BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B., A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 39, p. 54-59, 2005.
56. BERGAMINI, M. F.; BOLDRIN ZANONI, M. V., Anodic Stripping Voltammetric Determination of Aurothiomalate in Urine Using a Screen-Printed Carbon Electrode, **Electroanalysis**, v. 18, p. 1457-1462, 2006.
57. BERGAMINI, M. F.; DE OLIVEIRA, F.; ZANONI, M. V. B., Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso, **Eclética Química**, v. 30, p. 53-59, 2005.
58. HOYER, B.; JENSEN, N., Stabilization of the voltammetric response of organic analytes with self-passivating electrode reactions: Synergistic effect of surfactants and high buffer strength, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, p. 153-160, 2007.
59. HOSSEINZADEH, R.; SABZI, R. E.; GHASEMLU, K., Effect of cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) in determination of dopamine and ascorbic acid using carbon paste electrode modified with tin hexacyanoferrate, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 213-217, 2009.
60. BILIBIO, U.; DE OLIVEIRA, L. H.; FERREIRA, V. S.; TRINDADE, M. A. G., Enhanced simultaneous electroanalytical determination of two fluoroquinolones by using surfactant media and a peak deconvolution procedure, **Microchemical Journal**, v. 116, p. 47-54, 2014.
61. ELSABEE, M.; PRANKERD, R., Solid-state properties of drugs. II. Peak shape analysis and deconvolution of overlapping endotherms in differential scanning calorimetry of chiral mixtures, **International journal of pharmaceuticals**, v. 86, p. 211-219, 1992.
62. MARBÁN, G.; VU, T. T.; VALDÉS-SOLÍS, T., A simple visible spectrum deconvolution technique to prevent the artefact induced by the hypsochromic shift from masking the

- concentration of methylene blue in photodegradation experiments, **Applied Catalysis A: General**, v. 402, p. 218-223, 2011.
63. NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; HOLEN, B., Independent evaluation of a commercial deconvolution reporting software for gas chromatography mass spectrometry analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2056-2064, 2010.
64. TEOFILO, R. F., **Metodos quimiometricos em estudos eletroquimicos de fenóis sobre filmes de diamante dopado com boro**, Unicamp - SP, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Unicamp, 2007, tese de doutorado, p. 11-46.
65. BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.
66. SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J., Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v.35, p. 223-229, 2012.
67. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M., Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.
68. PEREIRA FILHO, E., **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**, São Carlos, EdUFSCar, 2015, p. 11-29.
69. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E., **Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria**, Editora Bookman, 2010, p. 105-113.
70. GOLET, E. M.; STREHLER, A.; ALDER, A. C.; GIGER, W., Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction, **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5455-5462, 2002.
71. SAMANIDOU, V.; DEMETRIOU, C.; PAPADOYANNIS, I., Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC, **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 375, p. 623-629, 2003.
72. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.
73. MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J., Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 731-748, 2011.

74. DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N., Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 199-207, 2016.
75. NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H., A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.
76. KOKOSA, J. M., Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 194-204, 2015.
77. JAIN, A.; VERMA, K. K., Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review, **Analytica chimica acta**, v. 706, p. 37-65, 2011.
78. KOKOSA, J. M., Advances in solvent-microextraction techniques, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 2-13, 2013.
79. GHONEIM, M.; RADI, A.; BELTAGI, A., Determination of Norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on a glassy carbon electrode, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p. 205-210, 2001.
80. RADI, A.; EL-SHERIF, Z., Determination of levofloxacin in human urine by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode, **Talanta**, v. 58, p. 319-324, 2002.
81. OLIVEIRA, L. H.; TRINDADE, M. A. G., Baseline-Corrected second-order derivative electroanalysis combined with ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction: simultaneous quantification of fluoroquinolones at low levels, **Analytical chemistry**, v. 88, p. 6554-6562, 2016.
82. WANG, F.; ZHU, L.; ZHANG, J., Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole-graphene-gold nanoparticles modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 642-647, 2014.
83. GOYAL, R. N.; RANA, A. R. S.; CHASTA, H., Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals. **Bioelectrochemistry**, v. 83, p. 46-51, 2012.
84. CHEN, Y.; ROSAZZA, J.; REESE, C.; CHANG, H.; NOWAKOWSKI, M.; KIPLINGER, J., Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 378-384, 1997.
85. RÊGO, J.; MOURA, J.; MOITA, G. C., Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação, **Química Nova**, v. 33, p. 471-477, 2010.
86. RAMOS, T. R.; SANTORO, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SINGH, A. K., Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em

formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 229-235, 2005.

87. CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**, Curitiba - PR, Programa de Pós-Graduação em Química - UFPR, 2006, p. 32-82.

88. MARTINS, J. V.; SOUZA, A. P. R. D.; SALLES, M. O.; SERRANO, S. H. P., Determinação de ácido acético em amostra de vinagre adulterada com ácido clorídrico-um experimento integrado de titulação potenciométrica e condutométrica, **Química Nova**, v. 33, p. 755-758, 2010.

89. COBELO-GARCÍA, A.; SANTOS-ECHEANDÍA, J.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, D. E.; ALMÉCIJA, C.; OMANOVIĆ, D., Improving the voltammetric quantification of ill-defined peaks using second derivative signal transformation: example of the determination of platinum in water and sediments, **Analytical chemistry**, v. 86, p. 2308-2313, 2014.

90. ALMÉCIJA, C.; COBELO-GARCÍA, A.; SANTOS-ECHEANDÍA, J., Improvement of the ultra-trace voltammetric determination of Rh in environmental samples using signal transformation, **Talanta**, v. 146, p. 737-743, 2016.

91. YARDIM, Y.; GÜLCAN, M.; ŞENTÜRK, Z., Determination of vanillin in commercial food product by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode. **Food chemistry**, v. 141, p. 1821-1827, 2013.

92. NISSIM, R.; COMPTON, R. G., Introducing absorptive stripping voltammetry: wide concentration range voltammetric phenol detection. **Analyst**, v. 139, p. 5911-5918, 2014.

93. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

97. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M., Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

98. TOLCHA, T.; MERDASSA, Y.; MEGERSA, N., Low-density extraction solvent based solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction for quantitative determination of ionizable pesticides in environmental waters, **Journal of separation science**, v. 36, p. 1119-1127, 2013.

99. VÁZQUEZ, M. P.; VÁZQUEZ, P. P.; GALERA, M. M.; GARCÍA, M. G., Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, **Analytica chimica acta**, v. 748, p. 20-27, 2012.

100. MOEMA, D.; NINDI, M. M.; DUBE, S., Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography, **Analytica chimica acta**, v. 730, p. 80-86, 2012.
101. HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á., Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 75, p. 130-137, 2013.
102. XIAO, R.; HE, Z.; DIAZ-RIVERA, D.; PEE, G. Y.; WEAVERS, L. K., Sonochemical degradation of ciprofloxacin and ibuprofen in the presence of matrix organic compounds, **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, p. 428-435, 2014.
103. GUO, W.; SHI, Y.; WANG, H.; YANG, H.; ZHANG, G., Intensification of sonochemical degradation of antibiotics levofloxacin using carbon tetrachloride, **Ultrasonics sonochemistry**, v. 17, p. 680-684, 2010.
104. HORWITZ, W., Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, **Analytical Chemistry**, v. 54, p. 67-76, 1982.