

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ADAPTAÇÃO DE UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA PARA  
MICROEXTRAÇÃO *IN SITU*: APLICAÇÃO NA ELETROANÁLISE DE  
CIPROFLOXACINA**

**JÉSSICA VITA GABANA**

**Dourados-MS  
Agosto/2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ADAPTAÇÃO DE UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA PARA  
MICROEXTRAÇÃO *IN SITU*: APLICAÇÃO NA ELETROANÁLISE DE  
CIPROFLOXACINA**

**JÉSSICA VITA GABANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, desenvolvido na Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade

**Dourados/MS  
Agosto/2016**

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

G112a	<p>Gabana, Jéssica Vita. Adaptação de uma célula eletroquímica para microextração <i>in situ</i> : aplicação na eletroanálise de ciprofloxacina. / Jéssica Vita Gabana. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 321f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Contaminantes emergentes. 2. Solventes eutéticos. 3. Microextração. I. Título.</p>
-------	---

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

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

---

### Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Adaptação de uma célula eletroquímica para microextração in situ: Aplicação na eletroanálise de ciprofloxacina", de autoria de Jéssica Vita Gabana, 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. Cláudio Teodoro de Carvalho  
Membro Examinador (UFGD)

Profa. Dra. Regina Massako Takeuchi  
Membro Examinador (UFU)

Dourados/MS, 31 de agosto de 2016

## **DEDICATÓRIA**

*“Destaco o amor incondicional que tenho por minha mãe Dalva e meu pai João. São os seres que me colocaram e ensinaram a enfrentar este mundo. E que em momento algum não mediram esforços para me ajudar a conquistar este sonho. Em especial a minha mãe que em todas as circunstâncias, de altos e baixos, esteve ao meu lado me apoiando e oferecendo seu grandioso amor. E ao meu irmão que torceu a todo instante por mim.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus Pai Todo Poderoso, que em sua infinita bondade me abençoou e deu forças para lutar com muita garra, perseverança e dedicação em busca de meus objetivos. Eis aqui, com este trabalho concluído, mais uma conquista.

A todos os familiares que sempre apoiaram minhas decisões e me incentivaram a seguir firme nesta caminhada. Assim como a todos os amigos e pessoas especiais que estiveram ao meu lado me oferecendo carinho e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis, de tristeza, apreensão e desespero. A esses anjos em minha vida, meu muito obrigada por me fazer ser mais forte, por me fazer acreditar que era possível e por me fazer uma pessoa melhor.

Ao professor Magno Trindade, um mestre de grandiosa capacidade, determinação e profissionalismo que se dispôs a me orientar e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho. Uma pessoa que admiro muito por sua integridade e responsabilidade. Sei que dizer “obrigada” não será o suficiente para agradecer pelo apoio dado e pela paciência exercida durante esta trajetória, principalmente nos momentos mais difíceis que pareciam impossíveis de serem vencidos.

Aos professores Cláudio Teodoro e Regina Massako, pela honra que me conceberam, em compor a banca de defesa. A todos os professores da Instituição que a mim socializaram seus conhecimentos. Em especial aos que sempre estiveram dispostos a me ajudar e aos que colaboraram de forma relevante para eu ter uma nova visão do mundo, contribuindo efetivamente para a minha formação.

Aos colegas da universidade, que conheci neste período, que juntos vivenciamos e compartilhamos muitas experiências, as quais são de grande valia para minha vida pessoal e profissional. Em especial ao Luiz, pelo compartilhamento de conhecimento, ajuda e por sempre mostrar aquela luz lá no final do túnel.

À Universidade Federal da Grande Dourados que me proporcionou um maior conhecimento científico.

Ficam aqui meus sinceros agradecimentos!!!

*"Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez."*

*Thomas Edison*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ch]Cl	Cloreto de Colina
B-R	Britton-Robinson
CIPRO	Ciprofloxacina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAS	Desvio Padrão do Intercepto
DES	<i>Deep Eutectic Solvents</i> (Solventes Eutéticos)
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
$E_{sw}$	Amplitude de Aplicação dos Pulsos de Potencial
FQ	Fluoroquinolona
HBA	Receptor de Ligação de Hidrogênio
HBD	Doador de Ligação de Hidrogênio
LIs	Líquidos Iônicos
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
Mal	Ácido Malônico
MELL	Microextração Líquido-Líquido
p- TsOH	Ácido p-toluenossulfônico
RPM	Rotação Por Minuto
TF	Tampão Formiato
$t_p$	Largura do Pulso
UV/Vis	Ultravioleta-Visível
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Pulso Diferencial
$W_{1/2}$	Largura do Pico à Meia Altura
$\Delta E_s$	Incremento de Potencial
$\tau$	Tempo de Aplicação dos Pulsos de Potencial
v	Velocidade de Varredura



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação da quinolonas.....	19
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para a determinação da CIPRO por VPD.....	38
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico para determinação de CIPRO utilizando ECV.....	40
<b>Tabela 4.</b> Resultados obtidos para a recuperação relativa da CIPRO, presente em amostra de água da torneira e água ultrapura.....	45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido nalidíxico. .... 17
- Figura 2.** Fórmula estrutural da fluoroquinolona Ciprofloxacina. .... 18
- Figura 3.** Célula eletroquímica utilizada nos experimentos: (A) e (B) célula parcialmente montada, (C) vista do interior da célula com os eletrodo de trabalho de carbono vítreo, contra eletrodo de fio de platina em espiral e o eletrodo de referência de Ag/AgCl, (D) eletrodo de trabalho de carbono vítreo, (E) célula eletroquímica com a amostra pronta para quantificação do analito e (F) sistema eletroquímica completo para extração. .... 26
- Figura 4.** Voltamogramas cíclicos, registrados para a oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> na (a) ausência e (b) presença de CIPRO; Tampão BR pH 3,0 na (c) ausência e (d) presença de CIPRO. Parâmetros da técnica: velocidade de varredura ( $v$ ) = 150 mV s<sup>-1</sup> e incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) = 4 mV. .... 29
- Figura 5.** Voltamogramas registrados (com correção da linha base) para oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO, sendo A H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte (meio ácido) e B tampão B-R  $0,04$  mol L<sup>-1</sup> pH 3,0 (meio tamponado), tendo a VPD para a e b na ausência e presença de CIPRO, respectivamente e VOQ para c e d na ausência e presença de CIPRO, respectivamente. Condições para VPD: amplitude ( $E_{sw}$ ) = 100 mV; incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) = 6 mV; largura do pulso ( $t_p$ ) = 0,025 s; tempo de pulso ( $\tau$ ) = 0,3 s e para VOQ:  $E_{sw}$  = 25 mV;  $\Delta E_s$  = 4 mV e frequência ( $f$ ) 10 Hz. .... 30
- Figura 6.** VPD registrados (com correção da linha base) para oxidação de  $6,24 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de: (a) tampão B-R pH 3,0; (b) TF  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>; (c) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e (d), (e) e (f) branco para os respectivos eletrólitos suporte. Parâmetros:  $\Delta E_s$  = 6 mV;  $E_{sw}$  = 100 mV;  $t_p$  = 0,025 s;  $\tau$  = 0,3 s. .... 32
- Figura 7.** Influência do pH na resposta da (A) corrente de pico ( $I_p$ ) e na resposta do (B) potencial de pico ( $E_p$ ) para oxidação eletroquímica de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> CIPRO sobre a superfície ECV em meio de tampão BR  $0,04$  mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0 – 9,0). Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s$  = 6 mV;  $E_{sw}$  = 100 mV;  $t_p$  = 0,025 s;  $\tau$  = 0,3 s. .... 33
- Figura 8.** VPD para oxidação  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio (A) à H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e (B) de tampão BR  $0,04$  mol L<sup>-1</sup>, sendo (a) medida imediatamente após o polimento

do ECV e imersão na célula eletroquímica, **(b)** e **(c)** medidas sucessivas sem a limpeza do eletrodo e **(d)** medida após agitação da solução para limpeza do ECV. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,015$  s;  $\tau = 0,3$  s. ....35

**Figura 9.** VPD registrados para oxidação de  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de **(A)** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e **(B)** em meio tampão B-R 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0 com diferentes tempo de agitação da solução. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,015$  s;  $\tau = 0,3$  s. ....35

**Figura 10.** Influência na efetividade da superfície do ECV após 30 medidas com intervalos de 2 minutos entre cada medida. VPD registrados para oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio a tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s. ....37

**Figura 11.** Dependência da corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função do aumento da concentração de CIPRO. Medidas obtidas sobre a superfície do ECV em solução tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> em pH 3,0. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s. Inserção: VPD registrados para as diferentes concentrações de CIPRO após utilização das melhores condições de trabalho. ....39

**Figura 12.** VPD registrados sobre a superfície do ECV sem **(A)** correção da linha base e **(B)** com correção da linha base associada à segunda derivada das curvas voltamétricas. **(a)** solução tampão B-R 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 3,0) preparado com água da torneira - amostra, **(b)** amostra enriquecida com  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO, **(c)** amostra enriquecida com CIPRO e pré-concentração eletroquímica (potencial de pré-concentração de 0,4 V e tempo de pré-concentração de 200 s), **(d)** amostra + DES **(e)** amostra enriquecida + DES. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s. ....42

**Figura 13.** Voltamogramas de pulso diferencial registrados sobre a superfície do ECV em solução tampão B-R 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 3,0) preparado com água da torneira para oxidação da CIPRO em diferentes concentrações contendo 120mg de DES, sendo: **(a)** amostra contaminada com  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO sem adição do DES, **(b)** amostra contaminada com  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO + 120 mg de DES, **(c)** e **(d)** adição sucessiva de  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO **(A)** com correção da linha base e **(B)** Curva de adição de padrão. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s. ....44

## RESUMO

Neste trabalho, realizou-se adaptação em uma célula eletroquímica para extração *in situ* e quantificação da ciprofloxacina (CIPRO), um antibiótico da classe das fluoroquinolonas. O sistema eletroquímico desenvolvido foi capaz de extrair e quantificar, em um mesmo recipiente, a CIPRO presente na amostra de água potável, eliminando muitas das etapas usadas na microextração líquido-líquido (MELL) convencional. A vantagem apresentada pela célula eletroquímica proposta é a sua praticidade, por permitir que os processos de extração e detecção sejam realizados no mesmo recipiente em uma única etapa. Na MELL convencional esses processos são feitos em várias etapas, o que pode acarretar em perdas de tempo e do analito. Utilizou-se como extratores os solventes de altas densidades, tais como solventes eutéticos (do inglês *Deep Eutectic Solvents* - DES), sendo o uso destes solventes na aplicação supracitada também considerado inovador, além de serem de baixo custo e ambientalmente correto — biodegradáveis e de baixa toxicidade. A adaptação da técnica é promissora por possibilitar a eliminação das várias etapas em um sistema MELL convencional, reduzir o tempo de análise e a probabilidade de erros, tornando o método mais confiável e com possibilidade de futuros estudos para uso *in loco* (portabilidade). Para certificar a viabilidade de aplicação da técnica desenvolvida, amostras de água ultrapura e água de torneira foram analisadas e, a partir da eletroanálise com a técnica de voltametria de pulso diferencial, obteve-se resultados satisfatórios em termos de pré-concentração e recuperação do analito.

**Palavras-chave:** Contaminantes emergentes, Solventes eutéticos, Microextração.

## ABSTRACT

In this work, an electrochemical cell was adapted for *in situ* extraction and quantification of ciprofloxacin (CIPRO), an antibiotic of the fluoroquinolones class. The electrochemical system allowed the extraction and quantification, in the same device, the CIPRO present in the potable water sample, eliminating many of the steps used in conventional liquid-liquid microextraction (LLME). The advantage presented by the cell electrochemistry proposal is its convenience by enabling the processes of extraction and detection are carried out in the same vessel, in only one step, while the conventional LLME these processes are done in several steps which may result in loss of time and the analyte. It was used as extractants the high densities solvents such as eutectic solvents (*Deep Eutectic Solvents* - DES) and the use of these solvents in the aforesaid application also considered innovative, in addition to low cost and environmentally friendly — biodegradable and low toxic. The adaptation of the technical is promising because it allows the elimination of the various steps in a conventional MELL system, reduce analysis time and the probability of errors, making a reliable method and the possibility of future studies for on-site use (portability). For ensure the viability of application, ultrapure water samples and tap water were examined and, from the electroanalysis using differential pulse voltammetry, it was obtained satisfactory results in terms of pre-concentration and recovery of the analyte.

**Keywords:** Emerging contaminants, Deep eutectic solvents, Microextraction.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Preparo de amostras complexas.....	13
1.2 Técnica de microextração líquido-líquido (MELL).....	13
1.3 Solventes Eutéticos .....	15
1.4 Aplicação - Antibióticos.....	16
1.5 Fluoroquinolonas.....	17
1.6 Antibióticos - resíduos e contaminantes .....	19
1.7 Técnicas Eletroanalíticas .....	20
1.7.1 Técnicas Voltamétricas .....	21
2 OBJETIVOS .....	22
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1 Reagentes, Soluções e Amostra.....	23
3.1.1 Reagentes .....	23
3.1.2 Soluções .....	23
3.1.3 Amostra .....	24
3.2 Equipamentos.....	24
3.3. Procedimento experimental .....	27
3.3.1 Experimentos Voltamétricos .....	27
3.3.2 Determinação de ciprofloxacina em amostra de água da torneira .....	27
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Comportamento voltamétrico da CIPRO .....	28
4.2. Influência do eletrólito suporte e pH .....	30
4.3. Estudo da limpeza do eletrodo.....	34
4.4. Estudo da repetibilidade de medidas .....	36
4.5. Otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais .....	37
4.6 Curva analítica .....	38
4.7 Determinação da CIPRO em amostra de água da torneira .....	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
6 REFERÊNCIAS .....	47

# 1 INTRODUÇÃO

## *1.1 Preparo de amostras complexas*

No contexto de análises residuais em amostras complexas como tecidos animais, solos, águas de mananciais entre outras, independentemente, da técnica analítica usada, a performance do método desenvolvido depende, inevitavelmente, do preparo da amostra e da eliminação de concomitantes da matriz. Não só para extrair e isolar o analito de interesse como também para o enriquecimento seletivo. Idealmente, a técnica analítica deve ser capaz de detectar o analito em níveis residuais, tão baixo quanto ng/L, e de modo a determinar, preferencialmente, multiclases de medicamentos simultaneamente [1-4].

O procedimento adotado para o preparo de amostra é, sem dúvidas, a etapa mais crítica do processo analítico, pois a precisão, exatidão e detectabilidade do método analítico dependem do quão satisfatório será o pré-tratamento da amostra. Sendo assim, ao aplicar o processo de pré-tratamento em amostras complexas, este deve ser mais eficiente do que os métodos convencionais. Pois ao trabalhar com amostras complexas, durante o procedimento, o analito pode ser extraído juntamente com componentes interferentes presentes na matriz por simplesmente apresentar características físico-químicas semelhantes, não ocorrendo, portanto, a pré-concentração do analito, um dos objetivos da técnica. Perante esta necessidade, alguns métodos de pré-concentração de analito que apresentam vantagens tais como: minimização da quantidade de solventes utilizados, simplicidade de operação, baixo custo e consumo de tempo, têm sido propostos [5-9]. Entre estes, a microextração Líquido-Líquido (MELL) tem atendido mais, satisfatoriamente, estes requisitos.

## *1.2 Técnica de microextração líquido-líquido (MELL)*

Amostras ambientais aquáticas representam grandes desafios no desenvolvimento de métodos analíticos, entre estes, a baixa concentração dos analitos de interesse, o efeito da matriz provocado pela interferência dos concomitantes e, possivelmente, a característica mais importante, o ajuste no volume de amostra para enriquecer e alcançar o limite de detecção esperado [10-13]. Para superar estes desafios, novas técnicas de preparo de amostras são necessárias e/ou as que existem devem ser melhoradas com o objetivo de atender a esses requisitos e também para reduzir fatores como custo, tempo, consumo de solventes, interferências e, por fim, todos esses requisitos adaptados a um sistema miniaturizado de extração [12, 14-16]. Portanto, a questão é: como atender a estes objetivos extraindo os analitos de interesse, com alto fator de enriquecimento, a partir de amostras ambientais ou

amostras biológicas altamente diluídas, sem o uso de solventes orgânicos tóxicos como comumente usado nas técnicas convencionais?

Para atender a essa demanda, vários métodos de pré-concentração de analito que visam diminuir a quantidade de solventes orgânicos, custo, consumo de tempo e geração de resíduos como também simplificar a operação, têm sido propostos [13, 17-24]. Neste sentido, a microextração líquido-líquido e as suas diversas adaptações, tem atendido, satisfatoriamente, a estes requisitos. Tendo como uma das suas principais vantagens à capacidade de pré-concentrar o analito de interesse, de amostras altamente diluídas, sem o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, o que torna o processo ambientalmente correto [17-24].

A MELL foi proposta por Assadi e colaboradores [17], e baseia-se na dispersão do solvente extrator na amostra aquosa, frequentemente, assistida por um agente dispersor. O contato entre as fases extratora e dispersora é melhorado por agitação em vórtex ou por ultrassonificação, torna o processo da MELL mais rápido e eficaz do que a extração líquido-líquido convencional [12]. Depois da extração, as fases são comumente separadas por centrifugação e a fase enriquecida, em geral gotas com volumes entre 10 e 50  $\mu\text{L}$ , contendo o(s) analito(s) de interesse pode ser diretamente analisada [12-13, 17-24]. Embora, solventes extratores de alta densidade e tóxicos como clorobenzeno, clorofórmio ou tetracloreto de carbono foram usados na técnica original, o uso de inócuos solventes menos e/ou não tóxicos tem proporcionado diversas modificações na MELL, aumentando o campo para novas aplicações da técnica [17-25].

Mesmo que a técnica MELL tenha sido descoberta em 2006, no Brasil seu uso ainda é recente e, além disso, tem sido restrito o pré-tratamento de amostras aquosas, para análises de analitos orgânicos, por técnicas cromatográficas. Ademais, pouco tem sido feito sobre a aplicação do preparo de amostras biológicas e/ou uso da MELL em análises por técnicas eletroquímicas. Todavia, um grupo espanhol, vem explorando as potencialidades da técnica de MELL e um método foi adaptado e utilizado para extração e pré-concentração de 2,4,6-trinitrotolueno [26] e mercúrio [27] em amostras aquosas. Nos dois trabalhos, os autores propuseram evitar o uso da instrumentação eletroanalítica clássica, com volumes excessivos de eletrólitos, mediante o desenvolvimento de uma técnica de preparação da amostra miniaturizada, visando eliminar o efeito da matriz, além da pré-concentração dos analitos até atingir o limite de quantificação desejado. Nos dois estudos supracitados, na preparação da amostra foi usada a MELL dispersiva com o líquido iônico (gerado *in-situ*) como extrator e obtenção de gotículas diretamente injetadas na superfície dos sensores eletroquímicos



(eletrodos impressos com e sem modificações com nanopartículas de ouro), cuja combinação permitiu a determinação dos analitos em amostras de água potável e ambiental em nível de traços.

Em outro trabalho, Oliveira e Trindade [28] desenvolveram uma metodologia para a quantificação simultânea de três fluoroquinolonas (FQs): levofloxacina (LEVO), norfloxacina (NOR) and danofloxacina (DANO), utilizando a combinação da técnica de MELL assistida por vortex e agitação mecânica a partir de um sistema miniaturizado. Neste trabalho, para detectar as três FQs, simultaneamente, em concentrações da ordem de  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> foi necessário associar a MELL a um tratamento matemático dos voltamogramas via segunda derivada.

Mesmo com toda a inovação e aprimoramentos aplicados na técnica [9, 26-28] se faz necessário uma metodologia que envolva menos etapas, equipamentos, reagentes e que seja mais simples. Seguindo essa mesma tendência de inovação, miniaturização e automação o objetivo deste trabalho está em desenvolver uma célula eletroquímica, a qual permite a combinação de técnicas como preparação de amostras - extração - e quantificação em uma única etapa, ou seja, extração e quantificação *in situ*. Neste momento, esta proposta surge como uma alternativa que possibilita empregar a técnica com maior praticidade comparando com os sistemas convencionais de MELL,

Portanto, neste trabalho pretende-se, inicialmente, adaptar uma célula eletroquímica a qual permite a realização do método de microextração líquido-líquido no mesmo recipiente onde será feita a detecção eletroanalítica. A seguir, desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a aplicação na determinação de um antibiótico em amostras de interesse socioambiental. Neste caso, a técnica de MELL *in situ* é inovadora e será considerada como a principal novidade desta proposta, uma vez que, não consta na literatura algum trabalho que utilize essa técnica associada à eletroanálise feitas em um único recipiente.

### ***1.3 Solventes Eutéticos***

Recentemente, estudos voltados para o desenvolvimento de solventes “verdes” tem se destacado significativamente pelo fato de oferecerem vantagens em detrimento aos solventes convencionais, como por exemplo, não serem tóxicos e minimizam a geração de resíduos [29].

Os solventes eutéticos, também chamado de DES (do inglês *Deep Eutectic Solvents*), e os líquidos iônicos, LIs, são os que mais se destacam neste conceito. Esses solventes, que apresentam características físico-químicas semelhantes, são utilizados tanto no processo de

síntese quanto de extração. Contudo, de acordo com Zhang [30], os DES são mais viáveis quando comparados com os LIs, por serem de fácil produção, baixo custo, atóxicos ou toxicidade quase nula, biodegradáveis entre outros aspectos favoráveis.

Os DES foram introduzidos desde 2003 por Abbott *et al.*[31], e a partir daí eles receberam atenção especial por dois motivos básicos: simplicidade na síntese agregada à elevada pureza e baixo custo. Estes solventes são formados por mistura de duas ou três substâncias, geralmente a interação é entre um sal de amônio, chamado de receptor de ligação de hidrogênio (HBA), e um doador de ligação de hidrogênio (HBD), que pode ser uréia, amina ou ácido [30-32].

De acordo com relatos encontrados na literatura, a aplicação do DES ocorre de diversas formas, por exemplo, na síntese orgânica, síntese de nano partículas, digestão de compostos inorgânicos, procedimento de extração e na eletroquímica [32-33]. No entanto, este é o primeiro trabalho à relatar os resultados obtidos com a utilização do DES em um sistema eletroanalítico que permite o procedimento de extração do analito e subsequentemente a sua quantificação em um único sistema (*in situ*), o que representa ser bastante promissor por reduzir etapas de um procedimento convencional de MELL.

#### ***1.4 Aplicação - Antibióticos***

Os medicamentos são essenciais à manutenção da saúde a nível mundial, tendo em vista que eles têm a função de manter a qualidade de vida dos seres vivos, seja evitando ou minimizando as doenças e epidemias. Diante de sua importância, existem listas de medicamento essenciais, que elencam os fármacos com maior nível de prioridade na saúde pública [34].

Perante o grande consumo de medicamentos, os antibióticos têm se consolidado como uma das mais prescritas classes de medicamentos, sendo empregado no tratamento de diferentes infecções bacterianas graves ocasionadas em humanos e em animais [35]. Os antibióticos, que podem ser classificados como compostos naturais ou sintéticos, os quais têm a função de inibir o crescimento ou provocar a morte das bactérias. Também devem apresentar algumas características que efetiva sua ação antimicrobiana, tais como: apresentar um amplo espectro de atividade, tornar mínimo os efeitos colaterais graves, minimizar ao máximo a possibilidade dos micro-organismos gerar resistência, apresentar boa absorção e excreção, ser eficaz independentemente do tipo de vias de administração, entre outras [36].

Os antibióticos têm seu marco na história mundial após a descoberta da penicilina, a qual motivou incessantes pesquisas nesta área. A partir de uma ampla gama de estudos, em

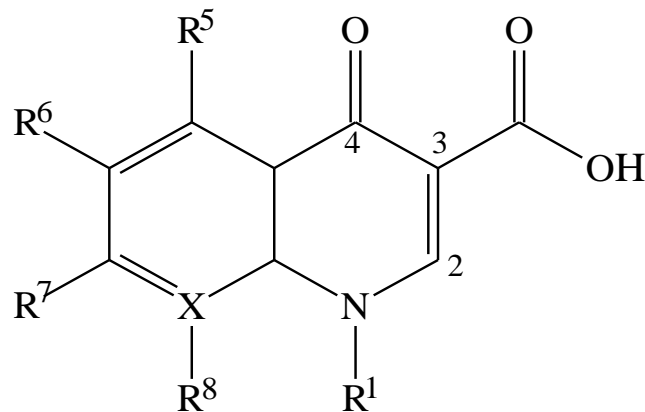
busca de mais agentes terapêuticos, surgem por volta de 1940 a 1960 algumas classes de antibióticos para o tratamento de bactérias Gram-positivas [37-38].

Já por volta dos anos 80, visando sintetizar antibióticos com efeito sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas surgem as fluoroquinolonas, uma classe derivada do ácido nalidíxico [39].

### 1.5 Fluoroquinolonas

O ácido nalidíxico, Figura 1, descoberto acidentalmente em 1962, foi classificado como um antimicrobiano da classe quinolona. As quinolonas foram divididas em quatro gerações, e o ácido nalidíxico, com a função de inibir infecções de trato urinário, foi classificado como uma quinolona de primeira geração.

**Figura 1.** Fórmula estrutural do ácido nalidíxico.



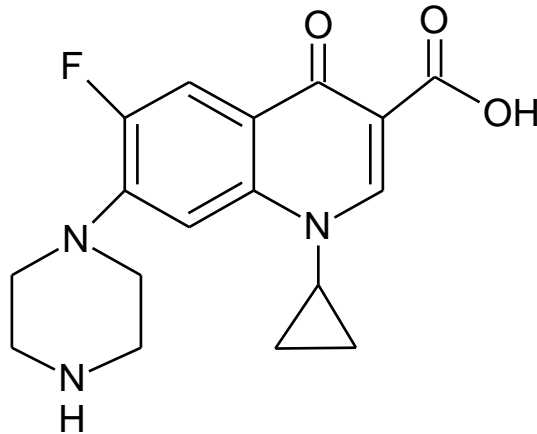
Fonte: Autor, 2016.

Diante das informações supracitadas, houve a necessidade de sintetizar um medicamento mais eficaz, com maior atividade antimicrobiana. Nestas tentativas, foram sintetizados três novos antibióticos: ácido piromídico, ácido pipemídico e cinoxacina. Isso foi possível a partir da alteração do núcleo quinolônico. Posteriormente, surgem as quinolonas de segunda geração, as chamadas fluoroquinolonas (FQs). A diferença entre as quinolonas de primeira e segunda geração está na estrutura química, nesta última geração foi introduzido na posição 6 do anel um átomo de flúor e na posição 7 um grupo piperazinil. Esta modificação conferiu algumas propriedades que as tornaram vantajosas em relação à sua antecessora, como: maior espectro de atividade, maior capacidade de penetração na célula bacteriana e conseqüentemente uma farmacocinética melhor [39-41].

Em geral, as quinolonas de segunda geração são utilizadas de forma notória no tratamento de doenças infecciosas geradas pelas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como: *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Brucella* e *Mycoplasma* [41-42].

A ciprofloxacina (CIPRO), Figura 2, pertencente a esta classe, é utilizada no combate a doenças relacionadas ao trato urinário, trato gastrointestinal, pneumonia, algumas doenças sexualmente transmissíveis, pele, ossos, tecidos moles, articulações, entre outras. Após administração por via oral, a ciprofloxacina na dosagem de 500 mg, atinge concentrações máximas no período de 60 a 90 minutos. Sendo a via urinária o principal meio de eliminação seguido da excreção fecal [43].

**Figura 2.** Fórmula estrutural da fluoroquinolona Ciprofloxacina.



Fonte: Autor, 2016.

E por fim, surge a terceira e quarta geração das quinolonas, as quais apresentam maior eficácia no combate às doenças de vias aéreas, aparelho gastrointestinal, pele, nas infecções do trato urinário, aparelho respiratório, infecções articulares e ósseas e doenças sexualmente transmissíveis [42].

As substâncias de cada geração das quinolonas são descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação da quinolonas.

<b>Geração</b>	<b>Agente</b>	<b>Indicações Clínicas</b>
Primeira geração	Ácido nalidíxico	Infecções do trato urinário
	Cinoxacina	
	Ácido piromídico	
	Ácido pipemídico	
Segunda geração (Fluoroquinolonas)	Norfloxacina	Infecções do trato urinário, infecções gastrointestinal, infecções das vias aéreas, infecções articulares, algumas doenças sexualmente transmissíveis, infecções da pele entre outras.
	Ciprofloxacina	
	Ofloxacina	
	Enoxacina	
	Lomefloxacina	
Terceira geração (Fluoroquinolonas)	Gatifloxacina	Pneumonia e bronquite crônica.
	Grepafloxacina	
	Levofloxacina	
	Esparfloxacina	
	Clinafloxacina	
Quarta geração (Fluoroquinolonas)	Trovalfloxacina	Todas as indicações anteriores.
	Moxifloxacina	
	Gemifloxacina	

### ***1.6 Antibióticos - resíduos e contaminantes***

Diante do uso indiscriminado desses agentes antimicrobianos surgem preocupações inerentes não somente à saúde humana, mas à contaminação do meio ambiente, diga-se do solo, da água, dos produtos alimentícios de origem animal e vegetal. A presença insistente desses resíduos em locais inadequados pode propiciar um ambiente ideal para alta proliferação das bactérias e conseqüentemente aumentar sua resistência frente a esses antimicrobianos, além de sofrerem mutações que originam novas linhagens de bactérias consideradas mais resistentes [38].

Além do risco à saúde causado pelo uso indiscriminado de antibióticos, como as FQs, existe a possibilidade de contaminação ambiental. Tem sido relatado que alguns ecossistemas, como efluentes, são alvos de despejos desses resíduos, os quais permanecem por longos períodos no meio ambiente influenciando significativamente na atividade dos microrganismos do local contaminado [44-45]. Esses resíduos que podem afetar a atividade biológica dos

seres vivos são chamados de contaminantes emergentes, os quais são considerados como uma grande preocupação a nível mundial, pois estudos revelam que baixas concentrações de antibióticos, na maioria dos ambientes naturais, são suficientes para o enriquecimento da resistência de bactérias. Um exemplo é o estudo de Gullberg *et al.* [46] que revelaram a existência de resíduos de CIPRO na concentração de pg/mL, concentração essa que pode ser encontrada em ambientes aquáticos e, são passíveis de promover a resistência de bactérias.

Desta forma, considerando os riscos ao meio ambiente e sobre a saúde humana, os antibióticos são vastamente estudados com inúmeras finalidades. Entre estas, destaca-se o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos simples que se adaptem as necessidades de análise de amostras mais complexas, como solos, biológicas (provenientes de humanos e animais), mananciais, fluviais, entre outras. Neste trabalho, tem-se como objetivo detectar e quantificar os resíduos desses medicamentos, uma vez que nenhum método oficial é recomendado para estas amostras.

### ***1.7 Técnicas Eletroanalíticas***

Diversas publicações envolvendo a quantificação de medicamentos utilizados para o tratamento de diferentes tipos de infecções, cujas análises são aplicadas em amostras mais complexas como sangue, plasma, urina, tecido humano e animal são reportados [47,48].

Dentre as metodologias alternativas para detecção e quantificação de FQs em amostras biológicas e formulações farmacêuticas, as que envolvem métodos cromatográficos, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência CLAE com detecção UV/Vis, têm sido as mais empregadas. Entretanto, os pesquisadores buscam alternativas para aperfeiçoar os sistemas de detecção, bem como a minimização de interferências oriundas da matriz, isso é possível a partir de sofisticados procedimentos de tratamento das amostras antes das análises [48-49].

As técnicas voltamétricas se destacam na determinação de fármacos por serem consideradas de baixo custo, apresentarem alta sensibilidade, exigirem pouco tempo para realização das análises, ser compatível com amostras consideradas turvas ou coloridas, as quais não necessitam de complexos pré-tratamentos das amostras antes das análises [50-51]. Em relação às FQs é possível o uso destas técnicas, visto que as substâncias derivadas da quinolona são eletroativas por apresentar um grupo carboxílico, um grupo carbonílico e duplas ligações entre C-C, ou seja, a partir de reações de oxi-redução é possível fazer a quantificação das substâncias derivadas dessa classe de antibióticos.

### 1.7.1 Técnicas Voltamétricas

As técnicas voltamétricas são bastante utilizadas devido as suas vantagens associadas ao baixo custo do equipamento, facilidade de operação, simplicidade nos testes, boa sensibilidade e detectabilidade e possibilidade de utilização de instrumentos alternativos. Um grande exemplo, de todos esses fatores citados acima, é o sistema eletroquímico utilizado nesta pesquisa. O qual não foi dispendioso, tão pouco complexo em relação ao manuseio e apresentou excelentes resultados.

A técnica eletroquímica de pulso diferencial (VPD) recebe destaque por ser uma das técnicas mais sensíveis e apresentar bom limite de detecção. Permite fazer determinações simultâneas, para a quantificação de três ou mais substâncias diferentes. Além da técnica de VPD destaca-se a voltametria de onda quadrada (VOQ), a qual surgiu nos anos 50 a partir dos estudos de Baker, todavia, foi considerada uma técnica limitada devido à necessidade de tecnologia mais avançada, o que era quase impossível para a época. Porém, nos anos 80 a VOQ ganhou força e foi muito utilizada devido a sua rapidez nas medidas e sensibilidade análoga ou até superior à VPD. Por exemplo, enquanto em uma análise, a VPD requer minutos para ser finalizada a VOQ gera resultados em apenas segundos [52].

A voltametria cíclica é indispensável nos estudos iniciais relacionados ao comportamento voltamétrico do analito de interesse. Permite, em uma única medida, indicar se o analito sofre transferência eletroquímica reversível ou irreversível em uma reação redox, além de fornecer informações sobre a existência de reações químicas acopladas ao processo eletroquímico.

Com relação às técnicas eletroquímicas, mesmo sendo reportado que sejam apropriadas para análise direta de amostras complexas sem a necessidade de preparo prévio, em alguns casos, o pré-tratamento é fundamental e indispensável. Principalmente, quando se trata de uma amostra que contenha baixíssimas concentrações do analito de interesse, a qual necessita de uma pré-concentração para obtenção de uma quantificação satisfatória e com o mínimo de interferência [18, 53-55].

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver, pela primeira vez, métodos de preparo de amostras empregando-se técnicas de microextração líquido-líquido assistida por agitação mecânica, tendo como solventes extratores: líquidos iônicos e solventes eutéticos para uso em sistema eletroquímico adaptável ao conjunto de extração e detecção (*in situ*).

Associar microextração às técnicas eletroanalíticas para proporcionar, respectivamente, o ajuste do volume e pré-concentração do analito de interesse a partir de amostras altamente diluídas.

Estudar o comportamento voltamétrico da CIPRO mediante o uso de técnicas voltamétricas em meio aquoso e/ou orgânico/aquoso sobre a superfície do eletrodo convencional de carbono vítreo acoplado à nova célula eletroquímica, a qual permite a extração e quantificação do analito em uma única etapa.



## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Reagentes, Soluções e Amostra

#### 3.1.1 Reagentes

O padrão da fluoroquinolona, ciprofloxacina, utilizado no estudo foi obtido pela Sigma-Aldrich, lote BCBJ9941V, com grau de pureza de 98%.

Os solventes eutéticos utilizados foram: cloreto de colina:ácido malônico ([Ch]Cl : Mal (1:1)), cloreto de colina:ácido p-toluenossulfônico ([Ch]Cl : p- TsOH (1:1)) sintetizados no laboratório da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) do estado de Mato Grosso do Sul - MS. Os líquidos iônicos foram: hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio (Fluka) e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio todos obtidos com a Sigma-Aldrich.

Os reagentes: ácido acético (Vetec), ácido bórico (Vetec), ácido fosfórico (Sigma-Aldrich), ácido fórmico (Dinâmica), formiato de amônio (Sigma-Aldrich), acetato de amônio (Vetec) e ácido sulfúrico (Vetec) foram utilizados no preparo das soluções de eletrólito suporte. Para obtenção dos diferentes valores de pH da solução tampão, o mesmo foi ajustado com hidróxido de amônio (Vetec).

A água utilizada nos experimentos foi ultrapurificada (condutividade superior a  $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) com um sistema de purificação osmose reversa (Gehaka, modelo OS 10LXE).

#### 3.1.2 Soluções

A solução estoque da CIPRO utilizada nas medidas eletroquímicas foi preparada na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , dissolvendo-se quantidade apropriada de CIPRO em água ultrapura obtida em um sistema de osmose reversa e algumas gotas de ácido acético (Vetec). As soluções de trabalho nas concentrações que variaram de  $1,0 \times 10^{-8}$  à  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foram obtidas a partir da adição de alíquotas de soluções nas concentrações de  $5,0 \times 10^{-4}$  e  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , preparadas a partir da solução estoque, diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

A solução do tampão Britton-Robinson (tampão B-R), utilizada como eletrólito de suporte, foi preparada a partir da mistura de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico, todos na concentração de  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ . Para o ajuste de pH que variou na faixa de 2,0 à 9,0 foi utilizada uma solução de hidróxido de amônio à 10% (v/v). O tampão acetato, na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparado pela dissolução da massa apropriada de acetato de amônio em ácido acético, enquanto que o tampão formiato, na concentração de

$1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , correspondeu a dissolução do sal formiato de amônio e ácido fórmico em água ultrapura.

### 3.1.3 Amostra

A amostra utilizada no estudo, água da torneira, foi coletada no Laboratório de Electroanalítica e Pesquisa em Biocombustíveis (LAE&PEBio) da Universidade Federal da Grande Dourados – MS.

### 3.2 Equipamentos

Para realização dos experimentos voltamétricos e aquisição dos dados, utilizou-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 204 (Metrohm), conectado a um notebook e controlado pelo software NOVA versão 1.11. Foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único com capacidade de 30 mL, contendo uma tampa de teflon com orifícios para inserção dos eletrodos (Figura 3). O sistema de eletrodos foi composto por um eletrodo auxiliar de fio de platina (Pt) enrolado em espiral, um eletrodo de referência de Ag recoberto com AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) imerso diretamente na solução e o eletrodo de carbono vítreo (2 mm de diâmetro) atuando como eletrodo de trabalho. Todas as medidas para ajuste de pH foram realizadas em um pH-metro digital (HANNA/Modelo HI 1110B).

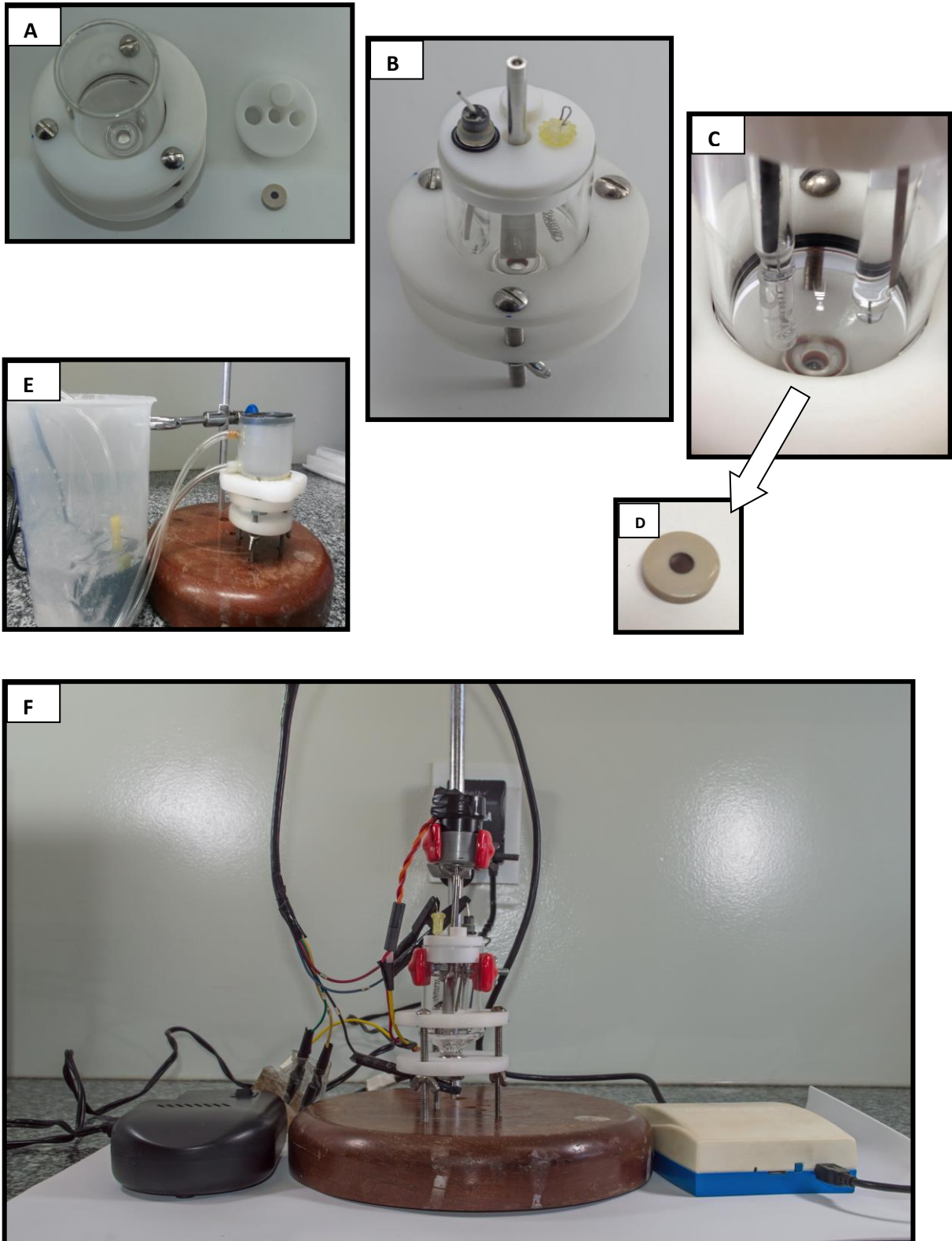
Na Figura 3 é apresentada uma ilustração da célula de extração/eletroquímica desenvolvida para atender aos objetivos desta proposta, a qual apresenta uma configuração simples e adaptações para uso no sistema MELL. Esta célula possui potencialidade para ser usada de modo simples e com maior praticidade, uma vez que o mesmo recipiente é usado tanto para extração quanto para detecção, utilizando eletrodos convencionais.

Assim, o sistema proposto difere dos sistemas convencionais de MELL, nos quais todos os processos são realizados separadamente e após a obtenção da fração enriquecida, exigem-se adaptações no sistema eletroquímico convencional para não haver diluição da fração (microgotas) antes da eletroanálise. Neste dispositivo, Figura 3, pretende-se evitar diluição do analito e diminuição das etapas do processo e, desta forma, a detecção dos analitos de interesse é realizada imediatamente após o procedimento de extração (*in situ*). Para atender aos objetivos propostos, utiliza-se como solventes extratores, líquidos mais viscosos como os líquidos iônicos e DES, os quais são de alta densidade e são relativamente bons eletrólitos.

Nesta célula totalmente adaptada é utilizada uma haste metálica conectada a um motor de impressora, ao alimentar este dispositivo com fonte de corrente contínua 12 V e ajuste da potência, a solução é agitada promovendo a interação entre o solvente extrator e o analito presente na amostra. Esta etapa é fundamental para ocorrer a dispersão do dispersor pela

amostra e pré-concentrar o analito de interesse analítico. A velocidade da agitação é controlada por uma fonte com ajuste de potência, cuja velocidade varia de 700 à 4000 rotações por minuto. Após a agitação o sistema deve ficar em repouso para que a fração enriquecida com o analito decante sobre a superfície do eletrodo, então um sistema de arrefecimento de temperatura foi montado, como ilustra a Figura 3E, a fim de favorecer essa etapa. A célula foi envolvida por um frasco de plástico com uma entrada e saída de água as quais foram conectadas a uma bomba de aquário, estando imersa em um recipiente com água gelada com temperatura média de 4,0°C, para resfriamento imediato do sistema. A Figura 3F representa o sistema completo da célula eletroquímica utilizada neste estudo.

**Figura 3.** Célula eletroquímica utilizada nos experimentos: (A) e (B) célula parcialmente montada, (C) vista do interior da célula com os eletrodo de trabalho de carbono vítreo, contra eletrodo de fio de platina em espiral e o eletrodo de referência de Ag/AgCl, (D) eletrodo de trabalho de carbono vítreo, (E) célula eletroquímica com a amostra pronta para quantificação do analito e (F) sistema eletroquímica montado contendo todos os dispositivos para extração e eletroanálise.



### ***3.3. Procedimento experimental***

#### **3.3.1 Experimentos Voltamétricos**

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo (ECV) adaptado à célula eletroquímica contendo 20 mL de solução do eletrólito suporte. Posteriormente, a solução foi submetida à agitação por uso de uma haste metálica adaptada com um motor de impressora sobre a célula, após a agitação ser cessada foi feita uma pausa de 5 segundos e, em seguida, foram efetuadas as medidas, mediante varredura em um intervalo de potencial pré-estabelecido. Após o registro de voltamogramas para a solução do eletrólito suporte, uma alíquota da solução estoque da CIPRO e/ ou do DES foi adicionada à célula, e um novo voltamograma foi registrado, de acordo com o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os voltamogramas foram obtidos pelas seguintes técnicas: voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. Ressalta-se que, ao se utilizar a técnica de voltametria cíclica a solução foi submetida à desaeração por 10 minutos, com nitrogênio (White Martins).

Para reestabelecer a superfície do eletrodo de carbono vítreo, a solução foi submetida a agitação por 2 minutos após cada medida voltamétrica. Todas as medidas foram obtidas em triplicata, sendo os resultados correspondentes à média aritmética dessas medidas.

#### **3.3.2 Determinação de ciprofloxacina em amostra de água da torneira**

A amostra de água da torneira foi coletada no Laboratório de Eletroanalítica e Pesquisa em Biocombustível (LAE&PEBio) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) do estado de Mato Grosso do Sul – MS. Alíquotas desta água foram utilizadas para preparar a solução do eletrólito de suporte, o tampão B-R em pH 3,0, e foi submetida a análise. Posteriormente, essa solução foi enriquecida com CIPRO na concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, a qual ficou armazenada em um frasco de vidro e sob refrigeração. Para a realização da análise do pico de oxidação da analito de interesse, um volume de 20 mL foi transferido para a célula eletroquímica, em seguida diferentes quantidades de DES, variando-se de 20 a 120 mg, foram adicionadas à célula. Antes de realizar a medida, a solução ficou sob agitação por 5 minutos, depois por mais 5 minutos sob arrefecimento de temperatura ( $\pm 5,0$  °C). Para efeito de comparação, a pré-concentração eletroquímica também foi realizada com a amostra enriquecida com CIPRO, com a aplicação de 0,4 V por 200 segundos. Os voltamogramas foram registrados de acordo com os melhores parâmetros instrumentais e experimentais previamente otimizados.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 Comportamento voltamétrico da CIPRO

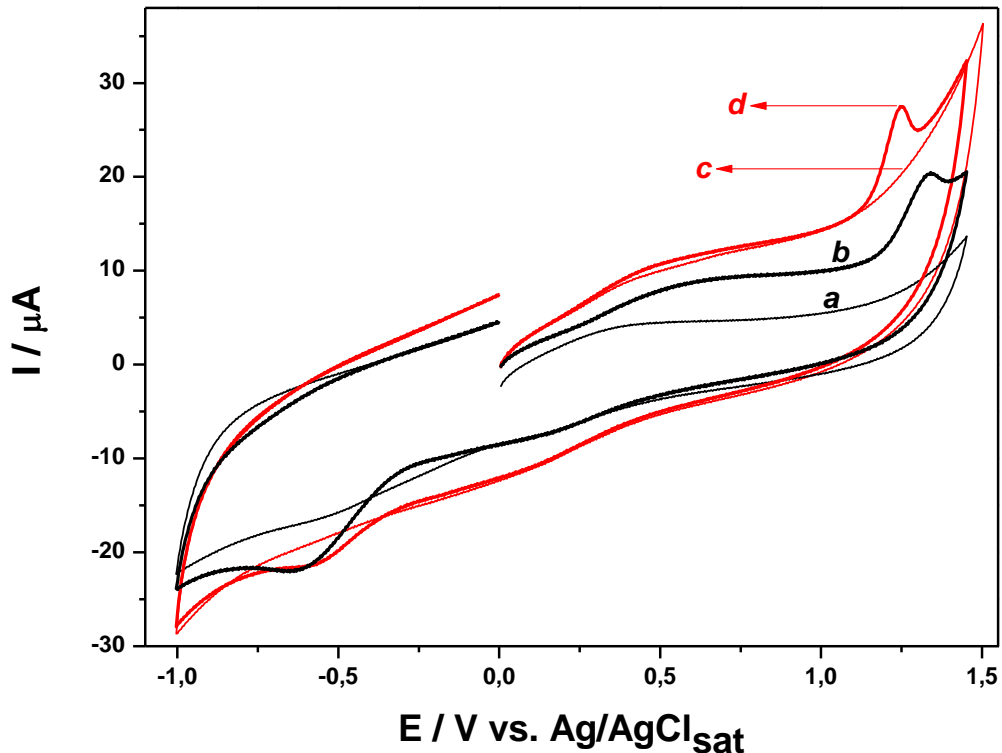
Inicialmente, os estudos foram direcionados para a avaliação do comportamento voltamétrico da CIPRO sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em sistema eletroquímico convencional. As técnicas voltamétricas utilizadas foram: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). Na Figura 4, observam-se os voltamogramas obtidos com a técnica de voltametria cíclica, os quais foram registrados utilizando-se como eletrólitos suporte o tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>, com valor de pH igual a 3,0, e o ácido sulfúrico na concentração de 1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

De acordo com a Figura 4 (voltamograma *a*), não há ocorrência de picos para o registro do voltamograma na presença apenas do eletrólito suporte, enquanto que na Figura 4 (voltamograma *b*), usando o ácido sulfúrico (1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) como eletrólito suporte, observa-se a existência de um pico com potencial de 1,33 V *vs.* Ag/AgCl, resultante da oxidação eletroquímica da CIPRO em concentração de 1,25×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Similarmente, na Figura 4 (voltamograma *c*), registrado apenas em meio de tampão TBR pH 3,0 como eletrólito suporte, não há ocorrência de picos, entretanto, no voltamograma *d* verifica-se apenas um pico anódico em potencial de 1,24 V *vs.* Ag/AgCl, também atribuído a oxidação da CIPRO (1,25×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>). De acordo com os estudos prévios, observa-se apenas picos anódicos para registro de voltamogramas em ambos os eletrólitos, os quais foram atribuídos à oxidação do grupo piperazinil presente na posição C-7 do anel quinolônico (Figura 2) [56, 57]. Além disso, não há ocorrência de pico catódico na varredura reversa, região entre 0 e 1,50 V *vs.* Ag/AgCl, indicando que o processo eletrodico para a oxidação da CIPRO é irreversível.

Avaliando-se o intervalo de potencial de 0 a -1,00 V *vs.* Ag/AgCl, após varredura de potencial no sentido inverso, os voltamogramas cíclicos registrados são caracterizados pela ocorrência de picos catódicos com potenciais de -0,52 V (voltamograma *b*) e -0,62 V (voltamograma *d*). Entretanto, estes picos são significativamente reduzidos e alargados quando comparados aos picos nos voltamogramas registrados na região anódica (Figura 4, voltamogramas *b* e *d*). Além disso, como o objetivo deste trabalho é propor uma técnica de extração *in situ*, na qual haverá monitoramento do tempo de extração sob agitação constante, será difícil evitar a entrada de oxigênio na célula e esta falta de controle poderá prejudicar as análises caso a redução seja o foco neste estudo. Assim sendo, somente o pico verificado na

região anódica foi escolhido para medidas posteriores e os parâmetros inerentes ao sistema foram avaliados.

**Figura 4.** Voltamogramas cíclicos, registrados para a oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> na (a) ausência e (b) presença de CIPRO; Tampão BR pH 3,0 na (c) ausência e (d) presença de CIPRO. Parâmetros da técnica: velocidade de varredura ( $v$ ) = 150 mV s<sup>-1</sup> e incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) = 4 mV.



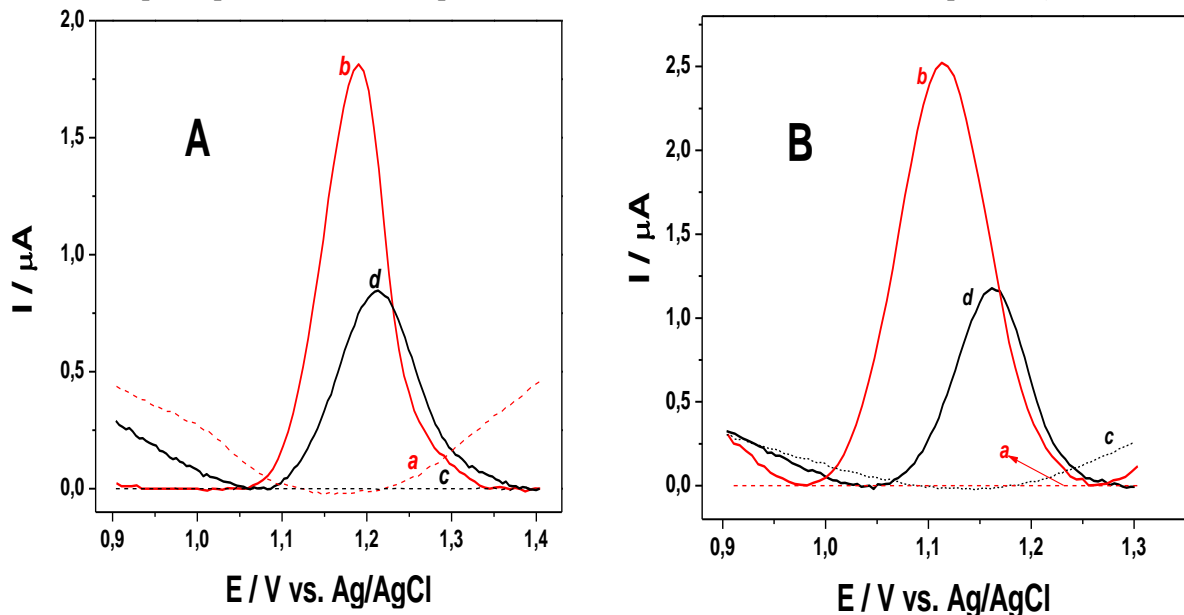
Fonte: autor, 2016.

Posteriormente, para efeito de comparação, foram realizados estudos com as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e onda quadrada (VOQ) para a oxidação eletroquímica da CIPRO. Esse estudo tem como objetivo testar outros modos de aplicação de pulsos de potenciais e, mediante a comparação da intensidade dos sinais, escolher a técnica com maior detectabilidade para desenvolver um método eletroanalítico mais sensível. Os voltamogramas apresentados na Figura 5A e B indicam que a VPD (voltamogramas *b*), quando comparada com a VOQ (voltamogramas *d*), é a melhor técnica por fornecer uma maior intensidade de corrente de pico, tanto em meio de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (Figura 5A) quanto em meio de tampão B-R pH 3,0 (Figura 5B). Diante destes resultados, a VPD foi escolhida para as medidas posteriores e os parâmetros inerentes a esta técnica foram avaliados.

Analisando a Figura 5, verifica-se ainda que o potencial de oxidação da CIPRO é deslocado para região de maior potencial ( $\sim 1,20$  V vs. Ag/AgCl) quando é utilizado o  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  como eletrólito suporte (Figura 5A), enquanto que na presença do tampão B-R (Figura 5B) o potencial de pico está deslocado  $0,10$  V ( $\sim 1,10$  V vs. Ag/AgCl) para região de menor potencial. Embora seja uma pequena diferença, este deslocamento de potencial para região de menor valor de potencial, ajuda na definição da linha de base (na presença de matrizes) bem como evita qualquer comprometimento causado pela proximidade com a oxidação do próprio eletrólito suporte.

Diante dessas considerações, observa-se que a otimização das condições experimentais e instrumentais deverá ser realizada com o objetivo de melhorar o perfil voltamétrico e obter uma maior intensidade da corrente de pico, visando propósitos analíticos quantitativos de determinação da CIPRO em amostras de interesse socioambientais.

**Figura 5.** Voltamogramas registrados (com correção da linha base) para oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de CIPRO, sendo **A**  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  como eletrólito suporte (meio ácido) e **B** tampão B-R  $0,04$  mol  $\text{L}^{-1}$  pH 3,0 (meio tamponado), tendo a VPD para **a** e **b** na ausência e presença de CIPRO, respectivamente e VOQ para **c** e **d** na ausência e presença de CIPRO, respectivamente. Condições para VPD: amplitude ( $E_{sw}$ ) = 100 mV; incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) = 6 mV; largura do pulso ( $t_p$ ) = 0,025 s; tempo de pulso ( $\tau$ ) = 0,3 s e para VOQ:  $E_{sw}$  = 25 mV;  $\Delta E_s$  = 4 mV e frequência ( $f$ ) 10 Hz.



Fonte: autor, 2016.

#### 4.2. Influência do eletrólito suporte e pH

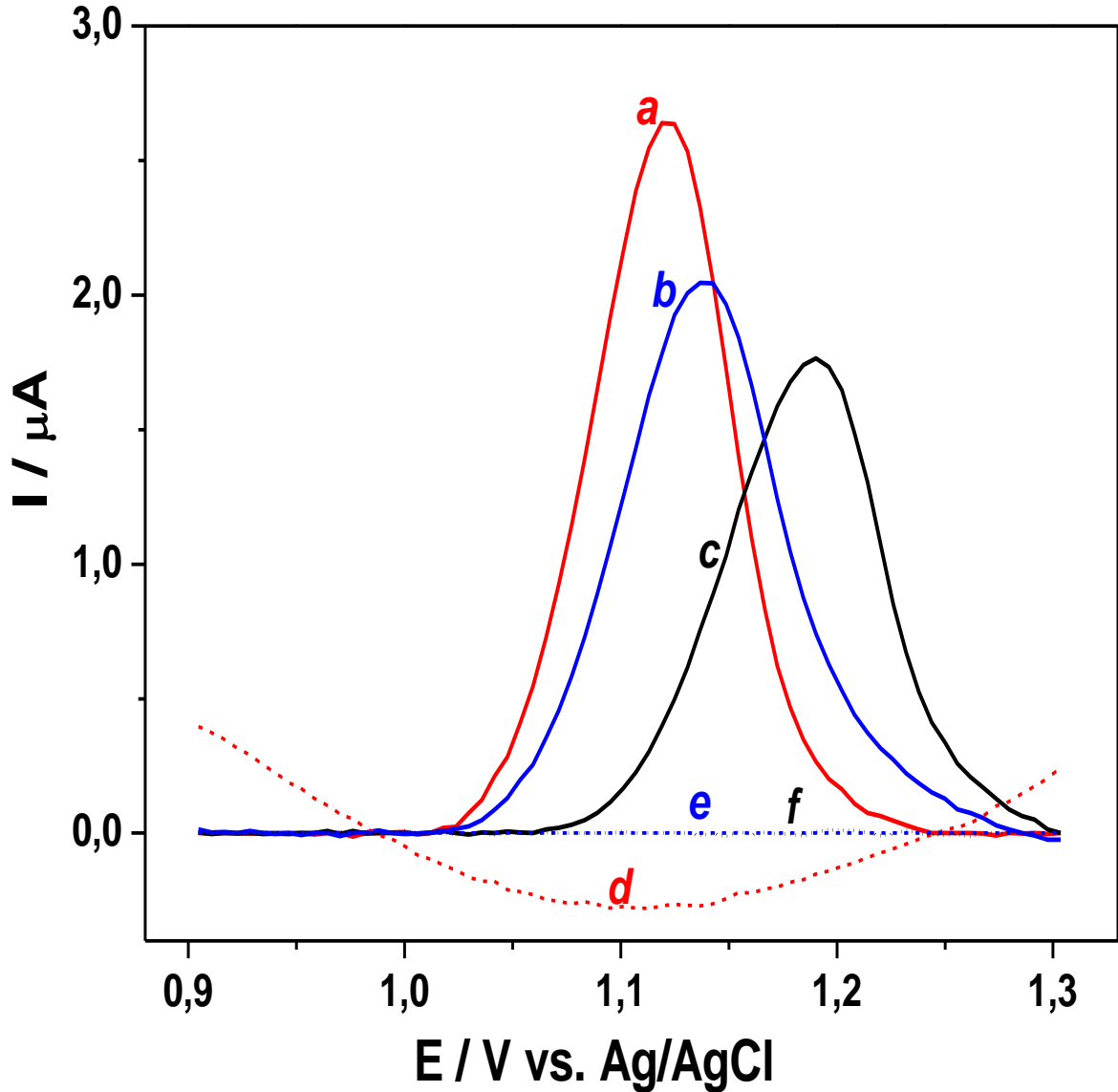
Considerado como uma solução de substâncias iônicas, o eletrólito suporte, que geralmente tem sua concentração cerca de cem vezes maior que as demais espécies presente



no sistema eletroquímico, apresenta propriedades vantajosas quando se trata de estudos eletroanalíticos. Por exemplo, promove alta solubilidade e uma boa condutividade elétrica à solução, porém, o mesmo deve ser quimicamente inerte, isto é, deve ter uma estabilidade que o impeça de reagir com substâncias presentes no sistema eletroquímico, sejam essas substâncias eletroativas ou não eletroativas. Contudo, é válido ressaltar que deve haver critérios na escolha de um eletrólito suporte, uma vez que o mesmo pode influenciar de diferentes formas nas propriedades da solução e na interface eletrodo-solução [58]. Sendo assim, é importante saber das particularidades da(s) substância(s) estudada e do sistema eletroanalítico a fim de obter os melhores resultados. A escolha do eletrólito suporte foi baseada na obtenção do melhor sinal voltamétrico resultante da oxidação da substância em estudo. Entende-se como bom sinal, correntes de pico com maior intensidade, estabilidade e picos ligeiramente separados e bem definidos.

De acordo com os estudos realizados (Figura 6), verificou-se que o tampão B-R na concentração de  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 3,0 promoveu maior influência na intensidade da corrente de pico, com um perfil voltamétrico melhor definido, quando comparado com o tampão formiato (TF) e o ácido sulfúrico, nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Neste caso, observou-se a ocorrência de uma corrente de pico com maior intensidade para registro de voltamogramas tendo o tampão B-R como eletrólito suporte (Figura 6, voltamograma *a*), seguido do TF Figura 6 (voltamograma *b*) e uma corrente de pico com menor intensidade quando na presença do ácido sulfúrico (Figura 6 voltamograma *c*) como eletrólito suporte. Os voltamogramas registrados na presença do ácido acético e tampão acetato não constam na Figura 6, pois os mesmos não foram eficientes como eletrólito suporte além de não ser detectada a presença de pico da CIPRO. Isso indica que estas soluções não apresentaram as propriedades essenciais de uma solução de eletrólitos suporte, tais como reduzir a resistência do meio, aumentar a condutividade elétrica do sistema, favorecer a condução da corrente, minimizar o efeito da dupla camada elétrica entre interface eletrodo-solução entre outros. Portanto, considerando que a intensidade de corrente é máxima com o uso do tampão B-R pH 3,0, esta condição foi adotada para atender aos propósitos analíticos quantitativos. Ademais, justifica-se a escolha deste tampão, pois comportamento similar foi observado em trabalho anteriormente publicado com estudos voltamétricos envolvendo algumas fluoroquinolonas [5].

**Figura 6.** VPD registrados (com correção da linha base) para oxidação de  $6,24 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de: (a) tampão B-R pH 3,0; (b) TF  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>; (c) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e (d), (e) e (f) branco para os respectivos eletrólitos suporte. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s.



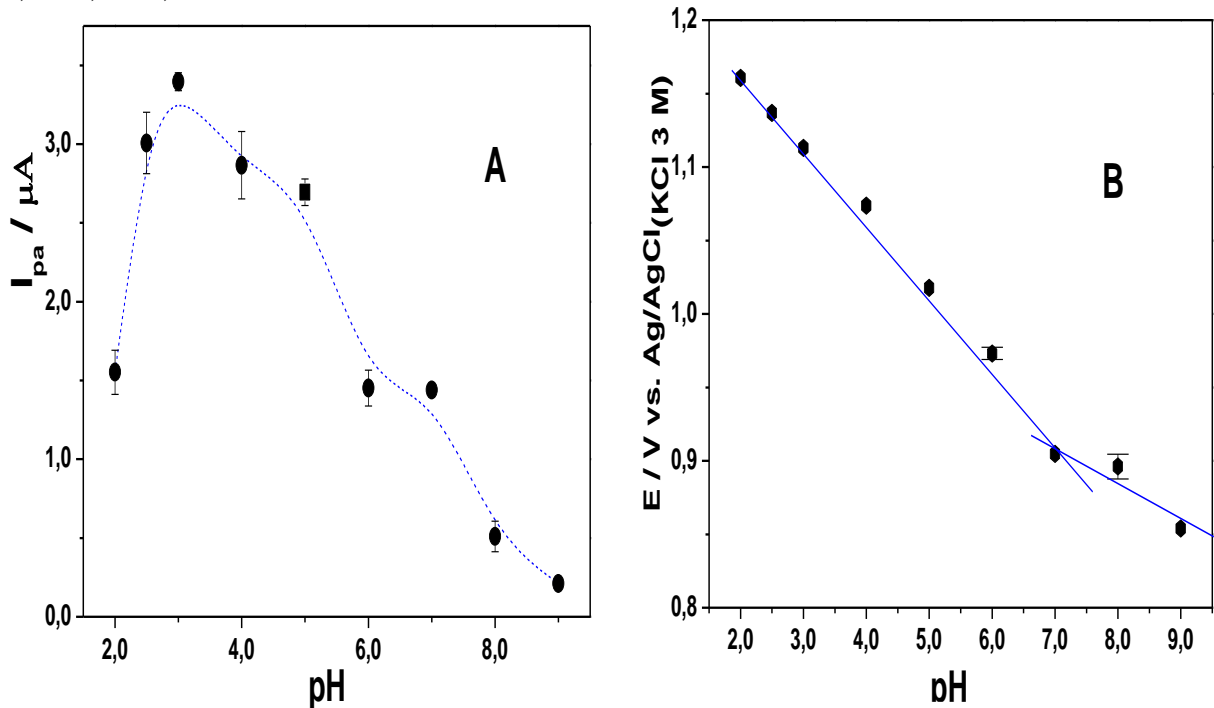
Fonte: autor, 2016.

O efeito da variação do pH (entre 2,0 e 9,0) na resposta voltamétrica também foi estudado e obtido a partir da voltametria de pulso diferencial para a oxidação da CIPRO sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão B-R  $0,04$  mol L<sup>-1</sup>. De acordo com a Figura 7A, a corrente de pico de oxidação para a CIPRO tem um máximo em valor de pH igual 3,0 e a partir do pH 4,0 a corrente diminui consideravelmente. Na Figura 7A, observa-se ainda que a maior intensidade de corrente para a FQ estudada é obtida em pH = 3,0, o qual foi mantido constante nos estudos posteriores. Essa ocorrência, de acordo com

Diab *et al* [6], é devido a CIPRO em pH baixo apresentar-se na forma catiônica o que facilita a transferência eletrônica quando comparada a meios eletrolíticos com pH neutro e/ou básico.

Com relação ao potencial de pico ( $E_p$ ) para oxidação eletroquímica da CIPRO, em concentração  $1,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , verifica-se que houve um deslocamento considerável em função do aumento de pH. Como observado na Figura 7B, houve deslocamento do potencial para valores menos positivos com a diminuição do pH. Este deslocamento com o aumento do pH, indica que existem reações de protonação acopladas aos processos transferência eletrônica, o que está concordante com o observado na literatura [7, 57]. Além disso, na Figura 7B, observa-se intervalos lineares com pontos de intersecção em um valor de pH, aproximadamente, igual a 7,0. Em um gráfico de potencial de pico *versus* pH, os pontos de intersecção entre duas regiões está relacionado com o pKa da substância em estudo, portanto está associado às mudanças na protonação dos grupos funcionais da molécula [5]. Diante disso, de acordo com o valor de intersecção no pH 7,0, pode considerá-lo como sendo o pKa para dissociação do grupo carboxílico da FQ.

**Figura 7.** Influência do pH na resposta da (A) corrente de pico ( $I_p$ ) e na resposta do (B) potencial de pico ( $E_p$ ) para oxidação eletroquímica de  $1,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  CIPRO sobre a superfície ECV em meio de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0 – 9,0). Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ ;  $E_{sw} = 100 \text{ mV}$ ;  $t_p = 0,025 \text{ s}$ ;  $\tau = 0,3 \text{ s}$ .



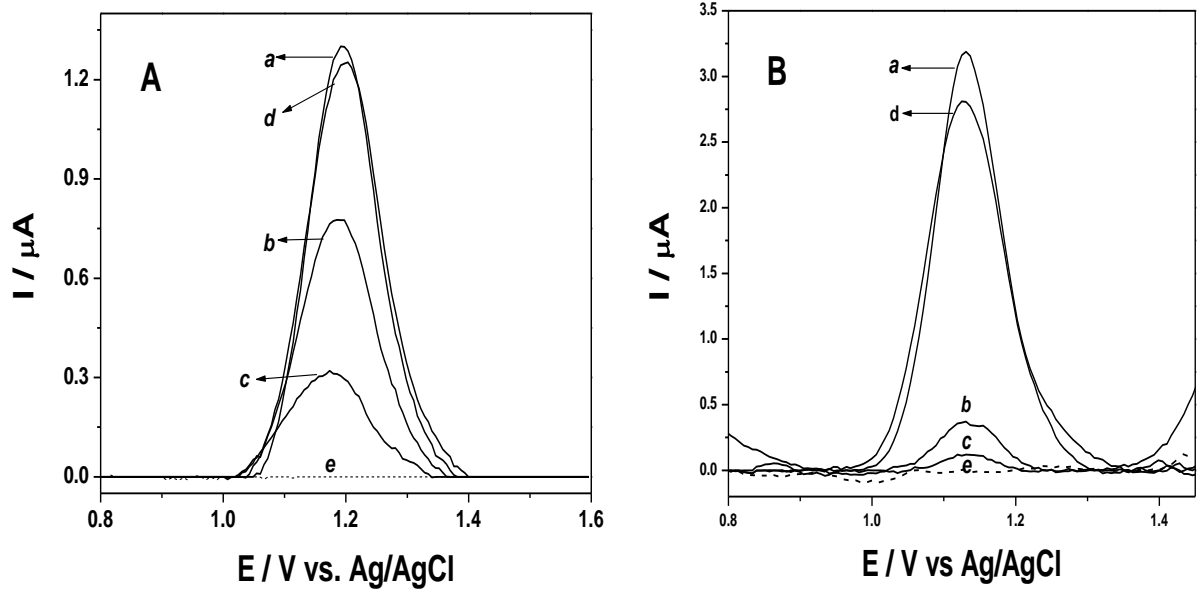
Fonte: autor, 2016.

### ***4.3. Estudo da limpeza do eletrodo***

Considerando a necessidade da limpeza da superfície do eletrodo de carbono vítreo, entre cada medida, a fim de eliminar a adsorção e inativação por produtos resultante do processo eletroquímico, estudos foram conduzidos com o objetivo de minimizar essa interferência na resposta eletroquímica. Nesse sentido, foi constatado que a agitação da solução renova satisfatoriamente a interface do eletrodo e minimiza o efeito da adsorção do produto eletrogerado. A Figura 8A e B, mostra voltamogramas obtidos com duas soluções de eletrólito de suporte, sendo ácido sulfúrico (Figura 8A) e de tampão B-R (Figura 8B), respectivamente. Foi feita a primeira medida, registrada pelo voltamograma *a*, em seguida foram realizadas duas medidas sucessivas sem a limpeza do eletrodo, voltamogramas *b* e *c*, evidenciando a diminuição da intensidade da corrente de pico após as varreduras sucessivas devido à adsorção do produto eletrogerado na superfície do ECV. Por fim, outra medida foi realizada após a agitação da solução do eletrólito por 2 minutos, voltamograma *d*, no qual observa-se que a intensidade da corrente de pico gerada é praticamente semelhante à observada no voltamograma *a*. Diante destes resultados, fica evidente que a agitação da solução promove a limpeza da superfície do eletrodo, indicando que a cada medida se faz necessário a agitação da solução para obtenção de resultados mais reprodutíveis.

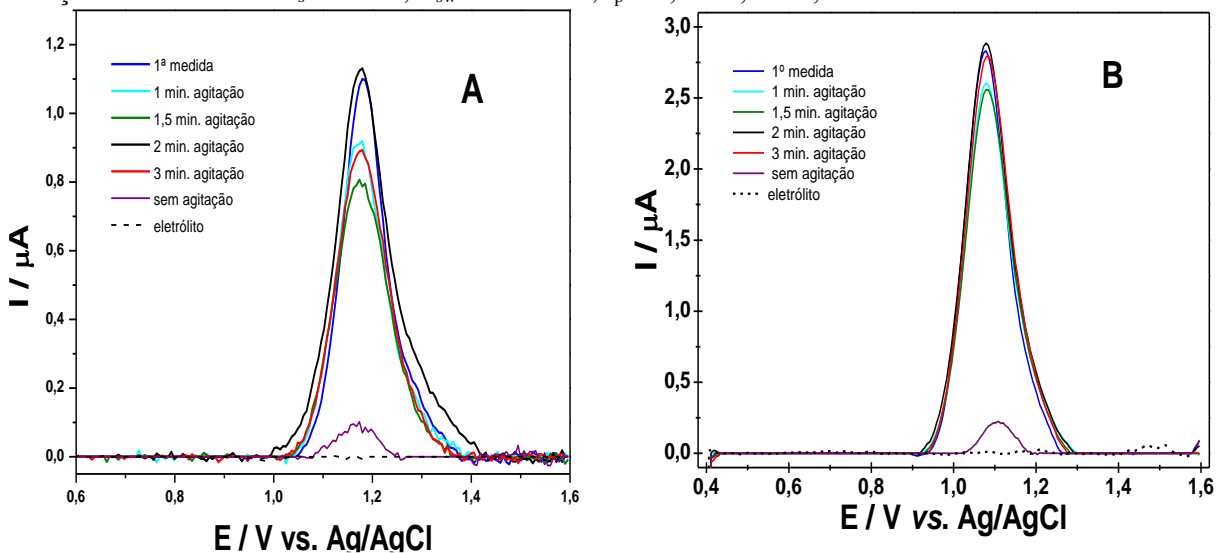
O tempo de agitação da solução, necessária para promover uma limpeza mais eficaz da superfície do eletrodo, também teve influência na intensidade da corrente de pico. Os estudos revelaram que ao agitar a solução por 2 minutos a reprodutibilidade é maior, como pode ser verificado na Figura 9 para o ácido sulfúrico (Figura 9A) e tampão B-R (Figura 9B) como eletrólitos de suporte, respectivamente.

**Figura 8.** VPD para oxidação  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio (A) à H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e (B) de tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>, sendo (a) medida imediatamente após o polimento do ECV e imersão na célula eletroquímica, (b) e (c) medidas sucessivas sem a limpeza do eletrodo e (d) medida após agitação da solução para limpeza do ECV. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,015$  s;  $\tau = 0,3$  s.



Fonte: autor, 2016.

**Figura 9.** VPD registrados para oxidação de  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio de (A) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e (B) em meio tampão B-R 0,4 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0 com diferentes tempo de agitação da solução. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,015$  s;  $\tau = 0,3$  s.



Fonte: autor, 2016.

Associado ao estudo do tempo de agitação da solução em busca da renovação da superfície do ECV, também foi estudada a influência da velocidade de agitação da solução do

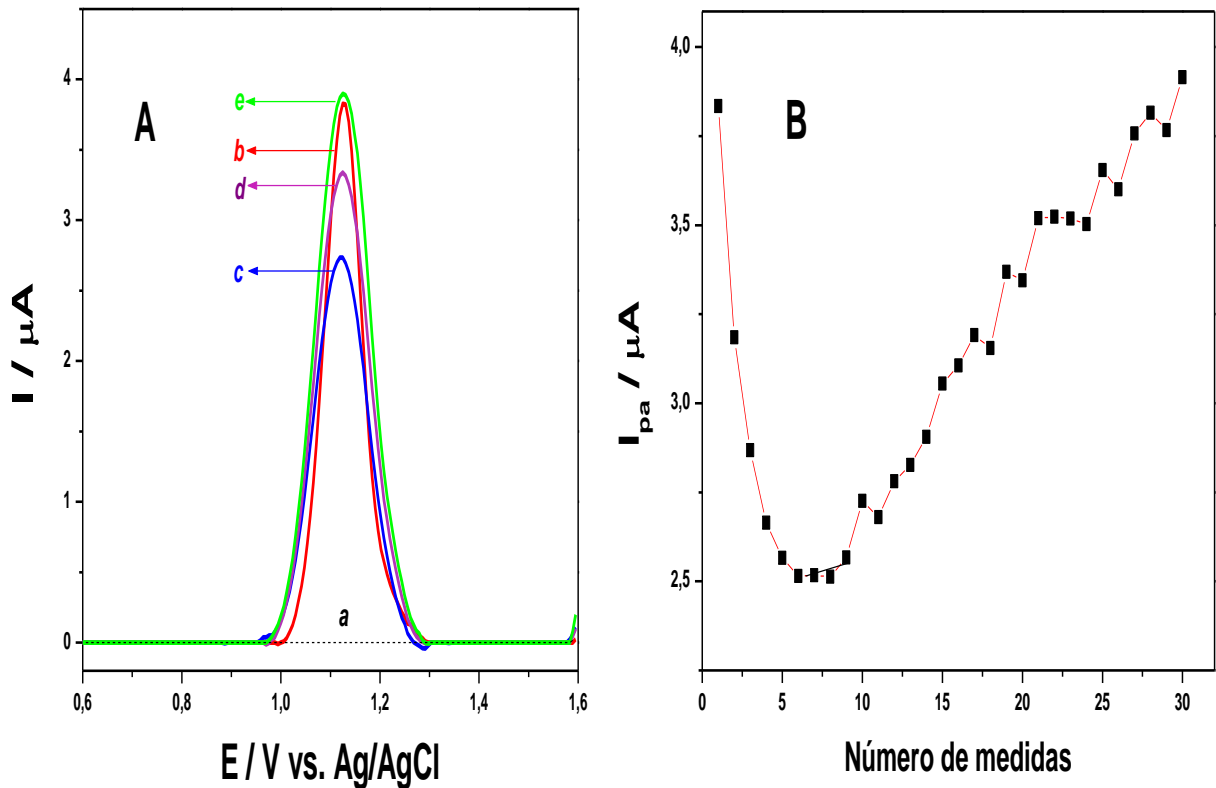
eletrólito suporte mediante o estudo da rotação por minuto (rpm). Foi constatado que 700 rpm foi o ideal para promover a limpeza da superfície do eletrodo, pois valores menores não foram eficientes na renovação da superfície, enquanto que valores superiores à 1200 rpm não foram viáveis por gerar muita turbulência na solução, implicando em perda de solução para fora da célula.

#### **4.4. Estudo da repetibilidade de medidas**

Considerando a influência na repetibilidade de detecção da CIPRO após várias medidas, foi realizado um estudo para verificar a precisão das medidas bem como a ocorrência de contaminação da superfície do ECV. Foram realizadas 30 medidas com intervalos de agitação equivalente à 2 minutos entre cada medida (Figura 10A). O voltamograma **b** (Figura 10A) representa a primeira medida, enquanto que o voltamograma **c**, que apresenta uma corrente de pico menor, representa a décima medida. No voltamograma **d**, é verificada a vigésima medida e, por fim, o voltamograma **e** a trigésima medida. Nota-se que após 10 medidas a intensidade da corrente sofre uma pequena diminuição, indicando que, há uma perda considerável de corrente devido a contaminação da superfície do ECV. Entretanto, após 20 medidas (com intervalos de agitação entre cada medida) a intensidade da corrente de pico aumenta gradativamente até atingir o valor inicial (voltamograma **b**), indicando que a atividade da superfície do ECV é reestabelecida. Na Figura 10B, que representa a influência do número de medidas na resposta da corrente de pico, também verifica-se que houve o reestabelecimento da superfície eletródica, comprovando que a agitação entre cada medida é uma etapa fundamental para prosseguir com os estudos.

Neste estudo a média da corrente de pico proveniente da oxidação da CIPRO foi de 3,16  $\mu\text{A}$  com DPR de 14,21 %. Diante desse estudo pode-se inferir que após 30 medidas, a atividade da superfície do ECV não fica comprometida, porém, em muitas medidas consecutivas houve necessidade de limpeza da superfície do eletrodo para reestabelecer a sua atividade.

**Figura 10.** Influência na efetividade da superfície do ECV após 30 medidas com intervalos de 2 minutos entre cada medida. VPD registrados para oxidação de  $1,25 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de CIPRO em meio a tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0. Parâmetros:  $\Delta E_s = 6$  mV;  $E_{sw} = 100$  mV;  $t_p = 0,025$  s;  $\tau = 0,3$  s.



Fonte: autor, 2016.

#### 4.5. Otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais

Os parâmetros operacionais da técnica de VPD foram submetidos a otimização em busca da melhora na detectabilidade mediante melhora na intensidade da corrente de pico. O estudo dos parâmetros instrumentais das técnicas voltamétricas tem sido de grande importância, pois influenciam consideravelmente no perfil do voltamograma bem como na intensidade do pico [8]. Por exemplo, a variação da  $E_{sw}$  para baixos valores fornece picos estreitos e bem definidos. Assim, o comportamento voltamétrico da CIPRO foi avaliado com a VPD, sobre a superfície do ECV, mediante a variação de alguns parâmetros, tais como incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ), amplitude de aplicação dos pulsos de potencial ( $E_{sw}$ ), largura do pulso ( $t_p$ ) e tempo de aplicação dos pulsos de potencial ( $\tau$ ), em busca da melhor condição de trabalho para a determinação deste analito.

Na Tabela 2 estão reunidos, além dos parâmetros instrumentais após a otimização de todos os parâmetros supracitados, também os parâmetros experimentais, como: o tipo de eletrólito suporte e o pH. Na escolha da melhor condição de trabalho considerou-se aqueles parâmetros, cujos valores apresentassem melhora significativa na intensidade do sinal sem comprometer a largura do pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ), nomeada como resolução voltamétrica.

**Tabela 2.** Parâmetros experimentais e instrumentais otimizados para a determinação da CIPRO por VPD.

Parâmetros estudados	Tipo ou intervalo testado	Otimizado
Técnica voltamétrica	VC, VPD, VOQ	VPD
Eletrólito de suporte	TBR, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , TF, TAc, HAc	TBR
pH (tampão BR)	2,0 – 9,0	3,0
Incremento de potencial ( $\Delta E_s$ )	4,0; 6,0; 8,0; 10 mV	6,0 mV
Amplitude de pulso ( $E_{sw}$ )	50; 75; 100; 125 mV	100 mV
Largura do pulso ( $t_p$ )	15; 25; 40; 50 ms	25 ms
Tempo de pulso ( $\tau$ )	75; 100; 200; 300; 600 ms	300 ms

#### 4.6 Curva analítica

Usando as melhores condições de trabalho, estudos foram realizados em diferentes concentrações de CIPRO (Figura 11, inserção) para obtenção da curva analítica (Figura 11), cujos parâmetros obtidos para esta curva estão reunidos na Tabela 3. A partir dos parâmetros de confiabilidade analítica obtidos da curva analítica, observa-se duas regiões lineares, uma entre 0,15 e 1,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 7$ ) e outra entre 2,49 e 8,60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 5$ ), cujas equações de regressão linear podem ser obtidas com os dados reunidos na Tabela 3.

Para a obtenção do Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ), foram utilizadas as equações 1 e 2, respectivamente, em que ( $SD_A$ ) representa o desvio padrão do intercepto, obtido a partir de três medidas, e ( $b$ ) representa o coeficiente angular na equação de regressão linear [45].

$$\text{LOD} = 3 \times SD_A / b \quad (1)$$

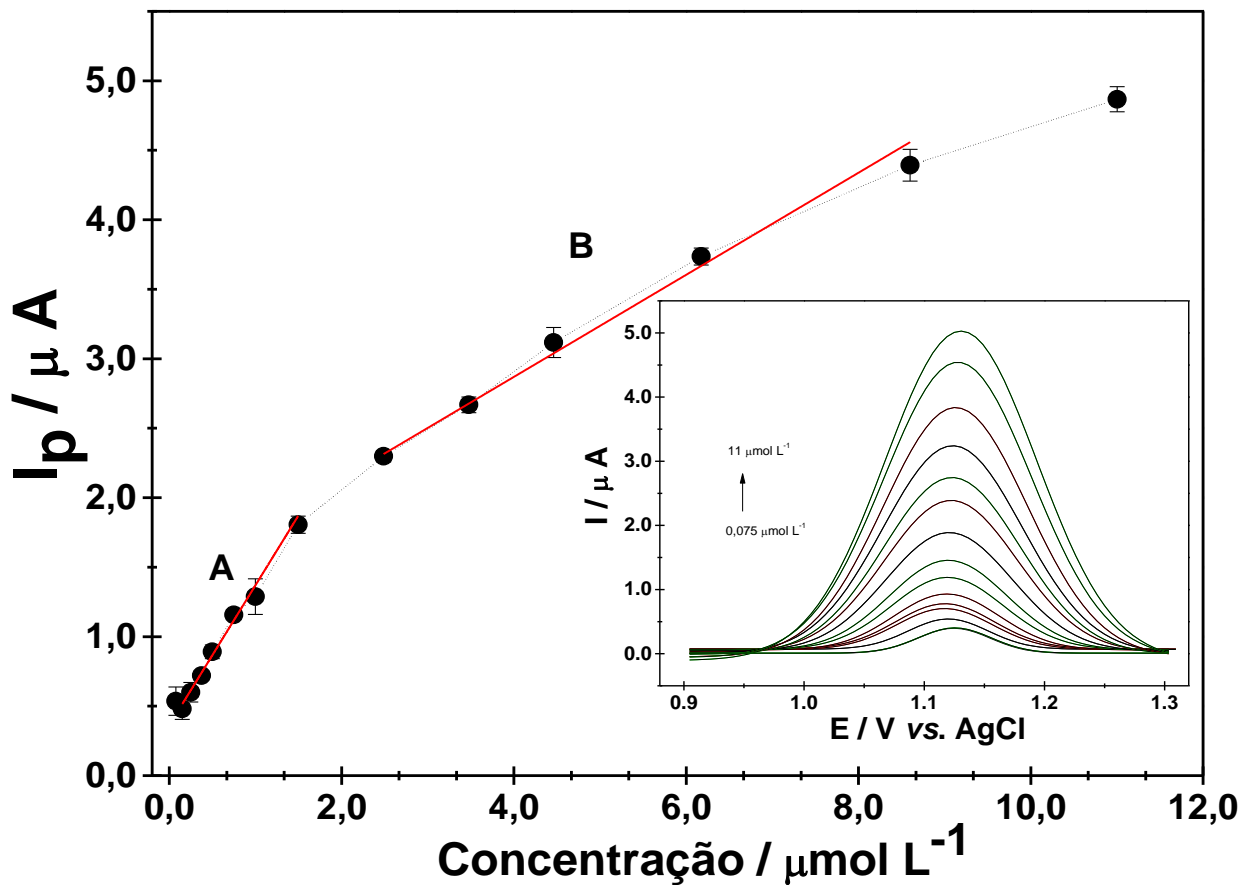
$$\text{LOQ} = 10 \times SD_A / b \quad (2)$$

Os valores obtidos para o LOD e LOQ foram apenas para a região de interesse analítico (região A), sendo  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  para o LOD e  $3,0 \times 10^{-7}$  para o LOQ, indicando que o sistema eletroquímico possibilita a utilização da metodologia proposta para a



quantificação desse analito na amostra de interesse. É evidente que, na ausência da etapa de pré-concentração o intervalo linear é satisfatório para detecção da CIPRO, com um coeficiente de correlação ( $r$ ) maior do que 0,998 ( $n = 7$ ). No entanto, o LOD foi de apenas  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e o LOQ  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (primeira região linear) e, nesta condição, não permite determinar diretamente a CIPRO em amostras contendo apenas resíduos deste analito.

**Figura 11.** Dependência da corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função do aumento da concentração de CIPRO. Medidas obtidas sobre a superfície do ECV em solução tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 3,0. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ ;  $E_{sw} = 100 \text{ mV}$ ;  $t_p = 0,025 \text{ s}$ ;  $\tau = 0,3 \text{ s}$ . Inserção: VPD registrados para as diferentes concentrações de CIPRO após utilização das melhores condições de trabalho.



Fonte: autor, 2016.

**Tabela 3.** Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico para determinação de CIPRO utilizando ECV e VPD.

Parâmetros	CIPRO	
	Região A	Região B
Faixa Linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,15 – 1,50	2,49 – 8,60
Intercepto ( $\mu\text{A}$ )	0,364	1,401
DP do intercepto	0,003	0,077
Inclinação ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$1,00 \times 10^6$	$3,67 \times 10^5$
Coefficiente de correlação	0,994	0,996
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,10	
LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,30	

DP = desvio padrão

#### 4.7 Determinação da CIPRO em amostra de água da torneira

O objetivo do uso de solventes de alta densidade como o DES é obter uma microgota (enriquecida com o analito) formada no fundo do recipiente e depositada sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Neste caso, a CIPRO, após extração e pré-concentração será analisada diretamente por técnicas voltamétricas em concentração satisfatoriamente detectável. Deste modo, para efeitos de comparação uma pré-concentração eletroquímica também foi feita, um método convencionalmente utilizado para a quantificação de substâncias eletroativas quando a concentração é baixa.

O método desenvolvido para determinação da CIPRO foi aplicado em amostra de água da torneira, a qual foi enriquecida com padrão da FQ, como descrito no procedimento experimental (seção 3.3.2). A Figura 12 mostra as respostas voltamétricas obtidas a partir do estudo da amostra de água da torneira antes e após as etapas de pré-concentração. Sendo a Figura 12A sem correção da linha base e a Figura 12B uma combinação entre a correção da linha base com a segunda derivada, esse processamento matemático foi feito a fim de melhorar o perfil voltamétrico e detectar satisfatoriamente o analito de interesse. Na Figura 12 (voltamograma *a*) é apresentado o voltamograma para a eletroanálise somente da água da torneira (branco), o qual é caracterizado pela ausência de picos, indicando que uma análise eletroquímica convencional, para a detecção de traços do analito FQ, sem nenhum tipo de tratamento não é possível. Similarmente, na Figura 12 (voltamograma *b*), voltamograma obtido para a eletroanálise de uma amostra de água da torneira enriquecida com  $1,0 \times 10^{-8}$  mol

L<sup>-1</sup> de CIPRO, verifica-se que não há picos que caracterize um processo faradaico do analito de interesse. Assim, fica comprovado que na ausência de qualquer etapa de pré-concentração, a quantificação por eletroanálise direta da CIPRO em amostras contendo apenas resíduos deste analito é comprometida e se faz necessário a aplicação de uma alternativa analítica para reverter essa condição.

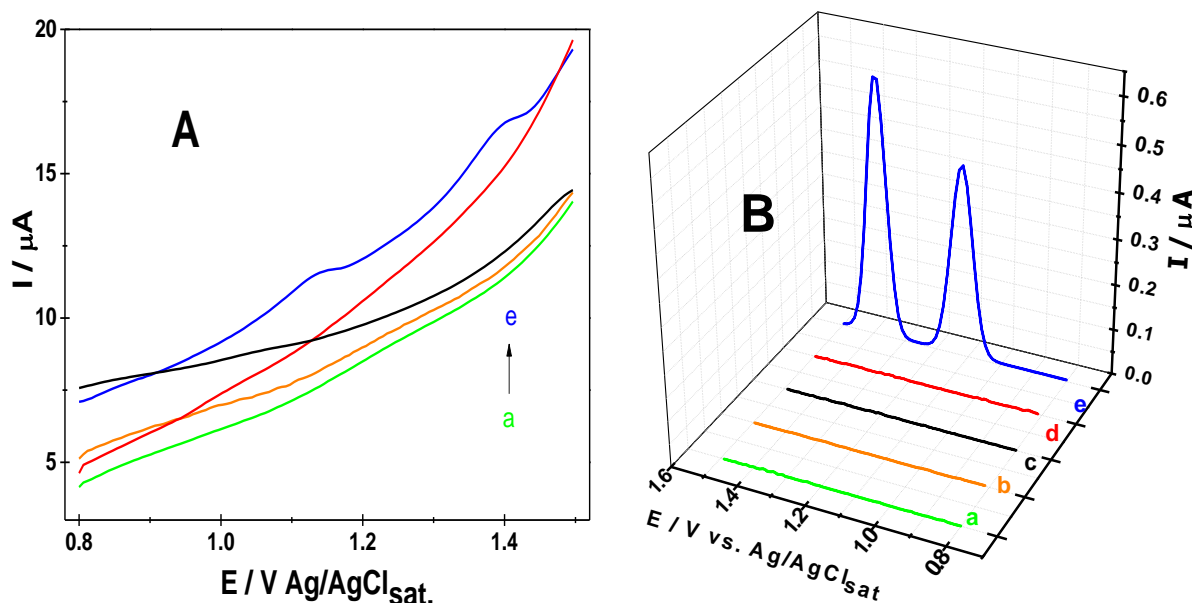
De acordo com as informações supracitadas e com a possibilidade de realização da pré-concentração eletroquímica antes da eletroanálise, estudos também foram realizados utilizando-se esta alternativa. Na Figura 12(voltamograma *c*), é apresentado o voltamograma registrado após pré-concentração eletroquímica em potencial de 0,40 V vs. Ag/AgCl após um período de 200 s, tempo de pré-concentração, estes valores foram baseado no trabalho de Oliveira e Trindade [28], em seu trabalho os analitos utilizados foram antibióticos da mesma classe da CIPRO, fluoroquinolonas, os quais apresentam propriedades físico-químicas semelhantes. Verifica-se que, mesmo com a etapa de pré-concentração eletroquímica não é observado pico voltamétrico para a CIPRO na região de potencial estudado, comprovando que não ocorre a detecção do sinal de oxidação deste fármaco nesta condição de análise. Além disso, a pré-concentração eletroquímica tem uma desvantagem relacionada à passivação da superfície do eletrodo, pois durante as análises produtos eletrogerados podem aderir à superfície do eletrodo dificultando o processo de transferência eletrônica [59,60].

Por fim, a Figura 12 (voltamograma *e*) reúne o registro de voltamograma após o procedimento de pré-concentração usando o dispositivo de microextração líquido-líquido *in situ* (célula mostrada na Figura 3) e o solvente extrator de alta densidade, DES. De acordo com o exposto na Figura 12 (voltamograma *e*), fica evidente que, nesta condição de pré-concentração, o sistema adaptado e o DES promovem a pré-concentração do analito uma vez que há ocorrência de dois picos bem definidos atribuídos à oxidação da CIPRO. Contudo, diferentemente do observado anteriormente para a eletroanálise da CIPRO na ausência da matriz, observa-se dois picos, o primeiro com potencial de 1,13 V e o segundo com potencial de 1,39 V vs. Ag/AgCl. Tal como sugerido por Martin e colaboradores [61] para estudo da cinética e mecanismos de oxidação da CIPRO em superfícies de hematitas, ambos os picos (Figura 12, voltamograma *e*) foram atribuídos a oxidação das aminas, grupos existente no anel piperazinil ligados na posição 7 do anel quinolônico da CIPRO, Figura 2 [61].

O voltamograma *d* da Figura 12 foi registrado para fins de comprovação da eficiência do processo, no qual, está representada a pré-concentração usando o dispositivo de microextração líquido-líquido *in situ* com a amostra de água da torneira isenta do analito de interesse. Portanto, verifica-se que não há ocorrência de picos na eletroanálise da amostra do

branco, provando que o solvente DES quando usado como extrator, extrai preferencialmente a CIPRO.

**Figura 12.** VPD registrados sobre a superfície do ECV sem (A) correção da linha base e (B) com correção da linha base associada à segunda derivada das curvas voltamétricas. (a) solução tampão B-R  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0) preparado com água da torneira - amostra, (b) amostra enriquecida com  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO, (c) amostra enriquecida com CIPRO e pré-concentração eletroquímica (potencial de pré-concentração de 0,4 V e tempo de pré-concentração de 200 s, (d) amostra + DES (e) amostra enriquecida + DES. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ ;  $E_{sw} = 100 \text{ mV}$ ;  $t_p = 0,025 \text{ s}$ ;  $\tau = 0,3 \text{ s}$ .



Fonte: autor, 2016.

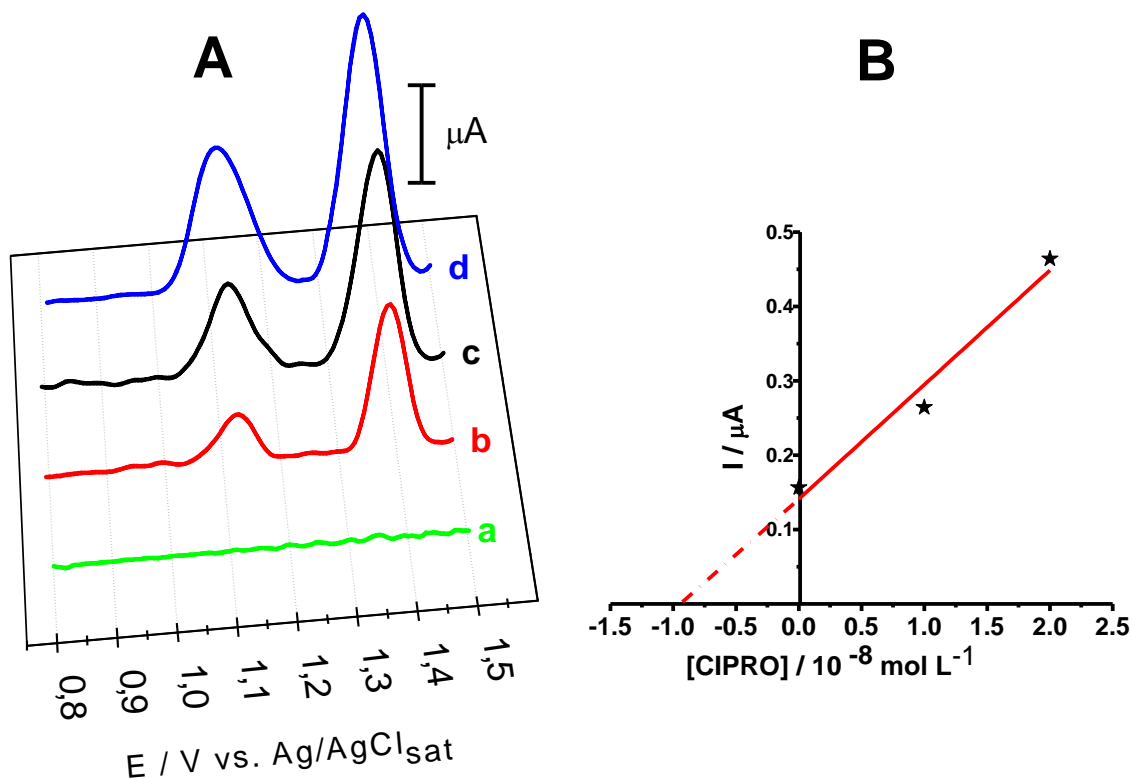
De acordo com os resultados obtidos fica evidenciado que a metodologia desenvolvida é viável e apresenta vantagens, visto que a extração e quantificação do analito utilizando o DES ocorreram em apenas uma etapa (célula eletroquímica adaptada), não necessitando de transferência de alíquotas entre as etapas. Todo o procedimento teve um tempo de duração de 10 minutos entre extração e quantificação. Ao comparar esse procedimento com outras metodologias desenvolvidas utilizando a microextração líquido-líquido [26, 27], fica notório que há várias vantagens, dentre elas: diminuição da quantidade de etapas do processo, uso de um único solvente, sem transferência de alíquotas da amostra de uma etapa para a outra e redução do tempo, demonstrando, portanto que esta metodologia é promissora com desempenho analítico altamente satisfatório.

A Figura 13 mostra as respostas voltamétricas obtidas para a oxidação da CIPRO, sendo a Figura 13A voltamogramas com a correção da linha base e aplicação do procedimento de segunda derivada, obtidas após a análise de amostras de água da torneira

contendo 0,01, 0,02 e 0,03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de CIPRO. No registro do voltamograma **a** (Figura 13A) não há ocorrências de picos que possam interferir na análise eletroanalítica, no voltamograma **b**, tem-se picos anódicos referentes à primeira adição, da mesma forma, o voltamograma **c** e **d**, apresentam picos voltamétricos bem definidos para as respectivas adições do padrão. De acordo com os voltamogramas da Figura 13 pode-se inferir que o comportamento voltamétrico da CIPRO não foi afetado por possíveis espécies interferentes presentes na água da torneira.

A curva de adição de padrão na Figura 13B foi obtida a partir das respectivas correntes de pico, sendo cada ponto representativo da média aritmética de três determinações analíticas, a qual apresenta linearidade satisfatória. A aplicabilidade do método se baseia na recuperação obtida a partir da curva de adição de padrão (Figura 13B). Nesta aplicação, a recuperação do analito de interesse foi de 92 %, considerado um valor satisfatório. Portanto, os estudos iniciais referentes à aplicação da microextração adaptada, indica que o método desenvolvido é promissor e pode ser empregado para quantificação da CIPRO em amostras reais, uma vez que os valores estão dentro de uma faixa aceitável.

**Figura 13.** Voltamogramas de pulso diferencial registrados sobre a superfície do ECV em solução tampão B-R  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0) preparado com água da torneira para oxidação da CIPRO em diferentes concentrações contendo 120 mg de DES, sendo: (a) amostra contaminada com  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO sem adição do DES, (b) amostra contaminada com  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO + 120 mg de DES, (c) e (d) adição sucessiva de  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO (A) com correção da linha base e (B) Curva de adição de padrão. Parâmetros da técnica:  $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ ;  $E_{sw} = 100 \text{ mV}$ ;  $t_p = 0,025 \text{ s}$ ;  $\tau = 0,3 \text{ s}$ .



Fonte: autor, 2016.

Adicionalmente, na Tabela 4 é apresentado os valores de recuperação relativa, bem como os valores de porcentagem do desvio padrão relativos (DPR) obtidos para a amostra de água da torneira com diferentes quantidades de DES. O valor da recuperação relativa foi calculado como a relação entre os valores de corrente de pico da amostra real e da água ultrapura, com o analito nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-8}$  e  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . Como é possível observar na Tabela 4, recuperações relativas variaram de 22 a 112 % ao analisar amostra de água contendo  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO com os valores de DPR entre 3,0 e 40 % demonstrando, portanto, que a melhor condição de estudo foi verificada ao se utilizar 80 mg do DES, pois gerou uma recuperação relativa de 99% e o desvio padrão relativo de 4,7%. Enquanto que valores de recuperações relativas entre 22 e 65 % foram encontrados ao analisar a amostra contendo  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de CIPRO com DPR variando de 0,7 a 5,6 %, evidenciando que a quantidade ideal de DES para extração do analito é de 40 mg. Nota-se que a amostra contendo a menor concentração do analito ( $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) apresentou uma

recuperação melhor ao utilizar uma menor quantidade de DES, enquanto que a outra amostra apresentou bons resultados ao utilizar o dobro de DES. Portanto, diante dos resultados é notável que a quantidade do DES influencia fortemente no comportamento voltamétrico da CIPRO e na eficiência de extração. Testes utilizando amostra de água da torneira contaminada com  $1,0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> CIPRO também foram realizados, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios em termos de precisão e exatidão, por isso os mesmos não constam na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados obtidos para a recuperação relativa da CIPRO, presente em amostras de água da torneira e água ultrapura.

Amostra	Quantidade de DES / mg	$1,0 \times 10^{-8}$ / mol L <sup>-1</sup>		$5,0 \times 10^{-9}$ / mol L <sup>-1</sup>	
		Recuperação / %	DPR / %	Recuperação / %	DPR / %
	120	116	3,0	22	5,6
Água da torneira	80	99	4,7	55	7,1
	40	39	21	65	0,7
	20	22	40	54	2,2

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos estudos realizados neste trabalho, e com a obtenção dos resultados tendo o tampão B-R como eletrólito suporte, fica evidente de que o sistema proposto — célula eletroquímica adaptada tanto para eletroanálises quanto para microextração líquido-líquido *in situ* —, pode ser utilizada para a determinação da CIPRO em amostras ambientais empregando como técnica voltamétrica a VPD. Considerando que o sistema proposto é novo e ainda requer avanços nos estudos, a recuperação obtida para o analito é aceitável demonstrando desempenho promissor para aplicação na determinação deste fármaco em amostras de águas altamente diluídas.

A utilização desta técnica eletroanalítica é recomendada devido ao baixo custo, fácil manuseio do equipamento, por apresentar elevada sensibilidade com valores satisfatórios de precisão e exatidão, sendo esses parâmetros altamente vantajosos quando comparado com outros métodos analíticos que na maioria são dispendiosos. Outra vantagem apresentada pela célula eletroquímica proposta é a sua praticidade, permitindo que os processos de extração e detecção sejam realizados no mesmo recipiente e com apenas uma etapa, enquanto que na MELL convencional esses processos são feitos em várias etapas, o que pode acarretar em perdas de tempo e do analito. Portanto, a utilização desta célula é promissora por possibilitar a eliminação das várias etapas em um sistema MELL, reduzir o tempo de análise e a probabilidade de erros, tornando o método mais confiável e com possibilidade de futuros estudos para uso *in loco* (portabilidade).



## 6 REFERÊNCIAS

- [1]. PETROVIC, M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. **Trends Environ. Anal. Chem.**, v. 1, p. 25-33, 2014.
- [2]. KOESTER, C. J. Trends in environmental analysis. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 3737–3754, 2005.
- [3]. PEDERSEN-BJERGAARD, S.; GREIBROKK, T.; Sample preparation - a modern and complex field. **J. Sep. Sci.**, v. 35, 2012.
- [4]. ALVAREZ, D. A.; JONES-LEPP, T. L. **Sampling and Analysis of Emerging Pollutants, Taylor & Francis Group**. Cap. 11, p. 199-226, 2011.
- [5]. BILIBIO, U. **Determinação eletroanalítica simultânea das fluoroquinolonas, Levofloxacin e Norfloxacin, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução**. Dourados – MS, Programa de Pós-Graduação em Química-UFGD, 2014. Dissertação de Mestrado.
- [6]. DIAB, N.; ABU-SHQAIR, I.; RADI, S.; AL-SUBU, M. The behavior of ciprofloxacin at a DNA modified glassy carbon electrodes. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 9, p. 1771-1783, 2014.
- [7]. USLU, B.; TOPAL, B. D., OZKAN, S.A. Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 74, p. 1191-1200, 2008.
- [8]. TRINDADE, M. A. G.; **Métodos eletroanalíticos e cromatográficos aplicados na análise de corantes usados como marcadores em combustíveis**. Araraquara - SP, Programa de Pós-Graduação em Química - UNESP, 2009. Tese de Doutorado.
- [9]. KOCUROVA, L.; BALOGH, I. S.; ŠANDREJOVA, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchem. J.**, v. 102, p. 11-17, 2012.
- [10]. MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **Trends Anal. Chem.**, v. 66, p. 176-192, 2015.
- [11]. SCHOONEN, J. W.; DUINEN, V. V.; OEDIT, A.; VULTO, P.; HANKEMEIER, T.; LINDENBURG, P. W.; Continuous-flow microelectroextraction for enrichment of low abundant compounds. **Anal. Chem.**, v. 86 (16), p. 8048-8056, 2014.

- [12]. ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J.; BALOGH, I. S. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **Trends Anal. Chem.**, v.49, p. 1-19, 2013.
- [13]. KOKOSA, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 71, p. 194-204, 2015.
- [14]. BUNYAKUL, N.; BAEUMNER, A. J. Combining electrochemical sensors with miniaturized sample preparation for rapid detection in clinical samples. **Sensors**, v. 15, p. 547-564, 2015.
- [15]. HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring. **Sensors**, v. 14, p.10432-10453, 2014.
- [16]. PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Anal. Chem.**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.
- [17]. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J. Chromatogr. A.**, v. 1116, p. 1-9, 2006.
- [18]. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **J. Chromatogr. A.**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
- [19]. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **Trends Anal. Chem.**, v. 71, p. 2-8 2015.
- [20]. 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. **J. Sep. Sci.**, v. 36, p. 1119-1127, 2013.
- [21]. YAN, H.; WANG, H.; QIN, X.; LIU, B.; DU, J. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 54, p. 53-57, 2011.
- [22]. VÁZQUEZ, M. M. R.; VÁZQUEZ, P. P.; GALERA, M. M.; GARCÍA, M. D. 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. **Anal. Chim. Acta.** v. 748, p. 20-27, 2011.
- [23]. EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; MORADI, M. Application of ionic surfactant as a carrier and emulsifier agent for the microextraction of fluoroquinolones. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 66, p. 264-270, 2012.

- [24]. 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. **Anal. Chem. Acta**, v. 730, p. 80-86, 2012.
- [25]. BALLESTEROS-GOMEZ, A.; RUBIO, S. Recente advances in environmental analysis. **Anal. Chem.**, v. 83, p. 4579, 2011.
- [26]. FERNÁNDEZ, E.; VIDAL, L.; INIESTA, J.; METTERS, J. P.; BANKS, C. E.; CANALS, A. Screen-printed electrode-based electrochemical detector coupled with in-situ ionic-liquid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of 2,4,6-trinitrotoluene. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406 (8), 2197, 2014.
- [27]. FERNÁNDEZ, E.; VIDAL, L.; MARTÍN-YERGA, D.; BLANCO, M. D. C.; CANALS, A.; COSTA-GARCÍA, A. Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples. **Talanta**, v. 135, p. 34-40, 2015.
- [28]. OLIVEIRA, L. H. de; TRINDADE, M. A. G. Baseline-Corrected Second-Order Derivative Electroanalysis combined with ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction: simultaneous quantification of fluoroquinolones at low levels. **Anal. Chem.**, v. 88, p. 6554-6562, 2016.
- [29]. VARMA, R. S.; BAIG, R. B. N. Alternative energy input: Mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 1559-1584, 2012.
- [30]. ZHANG, Q.; VIGIER, K. O.; ROYER, S.; JÉRÔME, F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 7108-7146, 2012.
- [31]. ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chem. Commun.**, v. 1, p. 70-71, 2003.
- [32]. DUAN, L.; DOU, L. L.; GUO, L.; LI, P.; LIU, E. H. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. **ACS Sustainable Chem Eng.**, v. 4, p. 2405-2411, 2016.
- [33]. YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Ultrasound assisted-deep eutectic solvent extraction of iron from sheep, bovine and chicken liver samples. **Talanta**, v. 136, p. 170-173, 2015.
- [34]. BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados – 1. Uso racional de medicamentos. 2. Condutas baseadas em evidências. 3. Atenção Primária à Saúde. Brasília, 2012.

- [35]. HARAGUCHI, T. Antibióticos: Classificação geral. **Revista Brasileira Medicina**, 57, n. 10, 1109, 2000.
- [36]. LACAZ, C. S. **Antibióticos**. São Paulo Edgar Blucher, 1975.
- [37]. PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M.; Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here. **Clin. Microb. and Infection**, v. 10, p. 18-22, 2004.
- [38]. FERNANDES, P.; Antibacterial discovery and development-the failure of success. **Nat Biotechnol.**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.
- [39]. APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 16, p. 5-15, 2000.
- [40]. SOUSA, I. C. **Interação da enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físico-químicas**. 2007 (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal, 2007.
- [41]. BRYSKIER, A. CHANTOT, J. F. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. **Drugs**, v. 49, p. 16-28, 1995.
- [42]. TILLOTSON, G. S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. **J. Med. Microbiology**, v. 44, p. 320-324, 1996.
- [43]. SCHELLACK, G. **Farmacologia - uma Abordagem Didática**. ed. fundamento, 2006.
- [44]. KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **J. Antimicrob. Chemotherapy**. London, v. 54, n. 2, p. 311-320, 2004.
- [45]. MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environ Pollut**. Amsterdam, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.
- [46]. GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.G.; ILBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. 1-9, 2011.
- [47] BELAL, F.; AL-MAJED, A. A.; AL-OBAID, A. M. Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. **Talanta**, v. 50, p. 765-786, 1999.
- [48]. EL-MAALI, N. A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 99-107, 2004.
- [49]. MOREIRA, G. F.; BALBO, A.; ACHETE, C. A.; BARIN, J. S.; WOLLINGER, W.; NOGUEIRA, R.; BITTENCOURT, C. F.; RODRIGUES, J. M. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da pureza de fármacos. **Produto & Produção**. Edição Metrologia. v. 11, n. 1, p. 22-29, 2010.

- [50]. SANTOS, A. L.; TAKEUCHI, R. M.; STRADIOTTO, N. R.; Electrochemical, spectrophotometric and liquid-chromatographic approaches for analysis of tropical disease drugs. **Curr. Pharm. Analy.**, v. 5, p. 69-88, 2009.
- [51]. GUPTA, V. K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - a review. **Anal. Biochem.** v. 408 p.179-196, 2011.
- [52]. ALEXO, L. M. A. **Voltametria: conceitos e técnicas**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo – Brasil. Disponível em <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articleI.php?u=dm9sdGFtZXRyaWEtY29uY2VpdG9zLWUtdGVjbmljYXM>>. Acesso em Junho de 2016.
- [53]. LANÇAS, F. M.; **Extração em fase Sólida**, Ed. Rima: São Carlos, 93 p. 2004.
- [54]. MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Sci. Chromatog.**, v. 4 (1), p. 35-51, 2012.
- [55]. CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quím. Nova.** v. 34(9) p. 1604-1617, 2011.
- [56]. GHONEIM, M. M.; A. RADI, A.; BELTAGI, A. M. Determination of norfloxacin by squarewave adsorptive voltammetry on glass carbon electrode. **J. Pharmac. Biomed. Anal.**, v. 25, p. 205-210, 2001.
- [57]. 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.
- [58]. AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Quím. Nova**, v 27, p. 813-817, 2004.
- [59]. MORETTO, L. M.; KALCHER, K. **Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors**. Springer. ed. 1, New York, 2014.
- [60]. BILIBIO, U.; 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. **Microchem. J.**, v. 116, p. 47-54, 2014.

[61]. MARTIN, S.; SHCHUKAREV, A.; HANNA, K.; BOILY, J-F. Kinetics and mechanisms of ciprofloxacin oxidation on hematite surfaces. **Environ. Sci. Technol.**, v. 49, p. 12197–12205, 2015.