



Ministério da Educação
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Química



**Método baseado em microextração líquido-líquido em alta
temperatura induzida por sal magnético, combinado com a
detecção eletroanalítica simultânea de medicamentos veterinários
em amostras agropecuárias**

Wesley Pereira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade

Campo Grande – 2018



Ministério da Educação
Universidade Federal de Mato grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Química



**Método baseado em microextração líquido-líquido em alta
temperatura induzida por sal magnético, combinado com a
detecção eletroanalítica simultânea de medicamentos veterinários
em amostras agropecuárias**

Wesley Pereira da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Doutor em Química.

DEDICATÓRIA

Dedico a DEUS por essa conquista

À mulher da minha vida Roselaine pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

À minha mãe, Matilde, e meu pai, Carlos Antônio, sem os quais nada disso teria acontecido.

Também dedico este trabalho ao meu filho Carlos Estevão minha maior alegria.

EPIGRAFE

Ainda que eu tenha o dom de profecia, saiba todos os mistérios e todo o conhecimento e tenha uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver amor, nada serei.

1 Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Magno Trindade**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira trabalho; meu respeito e admiração pela sua obstinação, capacidade de trabalho, e pela sua paciência, que com certeza em diversos momentos foi importante.

Ao professor Valdir Souza que permitiu que esse trabalho fosse desenvolvido em Dourados - MS.

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

Às instituições de financiamento Fundect e CNPq, em especial a instituição UFMS, pelas oportunidades concedidas.

A UFGD, pelo meu afastamento, o qual foi fundamental para conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

ACP = Análise de componentes do ponto principais

AHC = Análise hierárquica de Cluster

ANOVA = Análise de variância

BR = Britton-Robinson

CIPRO = Ciprofloxacina

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Conc. = Concentração

CV = Coeficiente de variação

ΔE_s = Incremento de potencial

DP = Desvio padrão

DSS = Dioctil sulfocinato de sódio

EABM = extração por agitação em barra magnética

ECV-NTC = Eletrodo de carbono vítreo revestido com nanotubo de carbono

EGM = Eletrodo gotejante de mercúrio

ELL = Extração líquido-líquido

ENRO = Enrofloxacin

EP = Erro puro

E_p = Potencial de pico

E_{sw} = Amplitude

f = Frequência

FAj = Falta de ajuste

FPSE = Fabric phase sorbent extraction

FQs = Fluoroquinolonas

FS-MELL-US-IS = extração com separação de fases baseada em microextração líquido-líquido assistida por ultrassom, induzida por sal

HCA = Hierarchical cluster analysis

I_p = Corrente de pico

LD = Limite de detecção

LLE = Liquid-liquid extraction

LQ = Limite de quantificação

LSS = Lauril sulfato de sódio

MELL-AT-CS-AM = microextração líquido-líquido em alta temperatura induzida por sal com agitação magnética

MEPS = Microextraction by packed sorbent,

MIP = Molecular imprinted polymer

MMQ = Mínimos quadrados parciais

MQ = Média quadrática

MSIAC = Modelagem suave independente por analogia de classe

nd = Não detectado

PCA = Principal component analysis

PCR = Principal component regression

PLS = Partial Least Squares

PMI = Polímero molecularmente impresso

PPD = Polarografia de pulso diferencial

PS-MSSI-HT-LLME = phase separation using magnetic stirring salt-induced high-temperature liquid-liquid microextraction

QAV = Química analítica verde

R = Regressão

r = Resíduo

RPP = Regressão por ponte principal

SIMCA = soft independent modeling of class analogy

TX-100 = Triton X-100

u = Velocidade de varredura

VC = Voltametria cíclica

VL = Varredura linear

VOQ = Voltametria de onda quadrada

VPD = Voltametria de pulso diferencial

VVL = Voltametria de varredura linear

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da quinolonas por geração.....	24
Tabela 2 - Técnicas analíticas recomendadas pelas principais Farmacopeias, utilizadas como referência para determinação de FQs.....	28
Tabela 3 - Parâmetros instrumentais otimizados para detecção simultânea de CIPRO e ENRO.	
Tabela 4 - Parâmetros instrumentais otimizados para detecção simultânea de CIPRO e ENRO.	60
Tabela 5 - Parâmetros experimentais e instrumentais estudados e otimizados para detecção simultânea das FQs.	73
Tabela 6 - Parâmetros de confiabilidade analítica obtidos para a curva de calibração individual de CIPRO e ENRO.	76
Tabela 7 - Parâmetros obtidos para a curva de calibração de CIPRO e ENRO, tal como na Figura 27.	78
Tabela 8 - Resumo dos parâmetros quimiométricos (com um planejamento fatorial completo 2 ⁵) usado para avaliar o procedimento MELL-AT-CS-AM e seu desempenho por meio da intensidade de pico da corrente.	79
Tabela 9 - Análise de Variância para o modelo quadrático.	82
Tabela 10 - Dados e parâmetros da matriz Doehlert utilizada na otimização do método MELL-AT-CS-AM.	83
Tabela 11 - Informações sobre os parâmetros otimizados no procedimento MELL-AT-CS-AM mostrado na seção experimental 4.8.2.	84
Tabela 12 - Resultados do ensaio de recuperação para avaliar a precisão e precisão do método proposto para quantificação de amostras de alimentos CIPRO e ENRO.	89
Tabela 13 - Parâmetros analíticos de alguns métodos eletroanalíticos propostos para a determinação ENRO e CIPRO.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido nalidíxico.	23
Figura 2 - Estruturas químicas de ciprofloxacina (CIPRO, A) e enrofloxacin (ENRO, B).	26
Figura 3 - Sinal de excitação para voltametria de pulso diferencial. Fonte.....	31
Figura 4 - (A) Forma de pulso empregada na VOQ mostrando a amplitude de potencial (E_{sw}), incremento de potencial (ΔE), Tempo de modulação T, e tempos de medição de corrente 1 e 2. B) voltamograma padrão obtido com pulso em forma de onda quadra onde; (A) corrente direta, (B) corrente inversa, (C) corrente total. Fonte: Wang, 2006.	32
Figura 5 - Ilustração da matriz Doehlert com duas variáveis empregadas.	40
Figura 6 - Esquema do procedimento de extração para a detecção direta.	46
Figura 7 - Esquema para o procedimento MELL-AT-CS-AM.	48
Figura 8 - Equipamento utilizado para executar o passo de extração de CIPRO e ENRO nas amostras	50
Figura 9 - Estruturas químicas de Ciprofloxacina (CIPRO, A) e Enrofloxacin (ENRO, B).	53
Figura 10 - Estrutura básica das FQs e o esquema geral de eletro-oxidação do grupo piperazinil.	55
Figura 11 - Esquema de oxidação das FQs CIPRO (A), ENRO (B).	56
Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial (com correção de linha base) registrados em ECV para: (a) em branco: tampão BR 0,040 mol L ⁻¹ (pH 4,0) como eletrólito de suporte e eletro-oxidação individual de (b) ENRO e (c) CIPRO, bem como para a mistura de ambos os FQs (d) todos em 5,0 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Condições: Incremento de potencial (ΔE_s) = 10 mV, amplitude de pulso (ΔE) = 75 mV, tempo de pulso = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms. Eletrodo de referência Ag / AgCl(KCl sat.).	57
Figura 13 - Influência da variação do Incremento de potencial sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de 5,00×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR 0,040 mol L ⁻¹ pH 4,0.	55
Figura 14 - Influência da variação da amplitude de modulação sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de 5,00×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR 0,040 mol L ⁻¹ pH 4,0.	56
Figura 15 - Influência da variação do tempo de modulação sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de 5,00×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR 0,040 mol L ⁻¹ pH 4,0.	57

Figura 16 - Influência da variação do incremento de potencial sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.	58
Figura 17 - Influência da variação da amplitude de pulso sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.	59
Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial (—) e onda quadrada (---), registrado sobre a superfície de ECV, para oxidação de CIPRO e ENRO ($5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: Tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Parâmetros: VPD: Incremento de potencial (ΔE_s) = 10 mV , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, Amplitude (E_{sw}) = 25 mV , tempo de pulso = 10 ms . VOQ: frequência (f) = 20 Hz , $E_{sw} = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$	67
Figura 19 - Efeito do pH do eletrólito no potencial de pico e corrente de pico de CIPRO e ENRO $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Solução tampão BR (Britton Robinson) (B) Solução tampão de acetato. Condições voltamétricas: $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, $E_{sw} = 75 \text{ mV}$, Tempo Intervalo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms . Eletrodo de referência Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{\text{saturado}}$	68
Figura 20 - Efeito da adição do surfactante LSS em diferentes concentrações na presença de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 4,00, para a determinação simultânea de (A) CIPRO e (B) ENRO, ambos em $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Condições para DPV: $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{sw} = 20 \text{ ms}$	65
Figura 21 - Voltamogramas PD: original (A) e o original com a linha base corrigido (B) para a eletro-oxidação de CIPRO e ENRO $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Sobre a superfície do eletrodo de ECV em tampão BR $0,040 \text{ mols L}^{-1}$, pH 4,0.	71
Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial, com a linha base corrigida (—), submetido ao processo matemático de deconvolução, onde são apresentados os sinais referentes a eletro-oxidação de ENRO (—), CIPRO (—), de $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Sobre a superfície do eletrodo de ECV em tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, com $5,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS. Condições: (ΔE_s) = 10 mV , $\Delta E = 75 \text{ mV}$, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms , Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl_{sat}).	72
Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial, com a aplicação: (A) de apenas a correção da linha base (—), correção da linha base juntamente com primeira derivada (—), (B) apenas a correção da	

linha base (—) e correção da linha base juntamente segunda derivada (—). Condições: 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ das FQs CIPRO e ENRO, sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 4,0 com 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS. Condições: (ΔE_S) = 10 mV, ΔE = 75 mV, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).....77

Figura 24 - (I) Voltamograma de segunda derivada mostrando o ajuste da linha de base convencional: (A) linha de base horizontal do pico frontal, (B) linha de base do pico-pico e (C) linha de base horizontal do pico traseiro. (II) voltamograma de pulso diferencial após o método derivativo de segunda ordem com linha base corrigida. Condições: E_S = 10 mV, E_{sw} = 75 mV, intervalo de tempo = 0,10 ms e tempo de modulação = 0,05 ms.718

Figura 25 - Equipamento de travamento e acomodação dos tubos falcon para a extração com temperatura controlada.86

Figura 26 - (A) Voltamogramas PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação individual de CIPRO e ENRO (I e II respectivamente), na faixa de concentrações de 0,25 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre a superfície do EI-CV. (B) Inserção: Curva de calibração, dependência da corrente de pico em função da concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 7.75

Figura 27 - (A) Voltamogramas PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação simultânea de CIPRO e ENRO, na faixa de concentrações de 0,25 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre a superfície do EI-CV. Inserção: (B) Curva de calibração, dependência da corrente de pico em função da concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 6.77

Figura 28 - Gráfico de Pareto obtido a partir de um projeto fatorial completo de 2^5 para avaliar o desempenho da extração de ENRO (A) e CIPRO (B). Valor na Tabela 8.....81

Figura 29 - Superfície de resposta para ENRO (A) CIPRO (B) obtida para fatores de sal e temperatura. * Corrente de desejabilidade obtida como Tabela 10.....83

Figura 30 - Voltammogramas pulso diferencial registrados para eletrooxidação de CIPRO e ENRO a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para diferentes procedimentos de extração: (a) HCl 0,7 mol L^{-1} , (b) Buffer BR e (c) MELL-AT-CS-AM como eletrólito de suporte, tampão BR (a 0,040 mol L^{-1} pH 5,0). Condições: (ΔE_S) = 10 mV, ΔE = 75 mV, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, na amostra de frango. Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).....86

Figura 31- Voltammogramas pulso diferencial derivativos de segunda ordem corrigidos de linha de base para: (a) amostra de frango com $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ CIPRO e ENRO após uma MELL-AT-CS-AM, (bd) adições sucessivas ($20 \mu\text{L}$) de FQs ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Inserção: curva de adição padrão para as medidas de recuperação de adição

.....88

LISTA DE FÓRMULAS

Efeito médio

$$= \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Equação 128

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

Equação 229

$$di = \left(\frac{y-L}{H-L} \right)$$

Equation 340

$$Di = \sqrt[m]{d_1^{p_1} d_2^{p_2} \dots d_n^{p_n}}$$

Equation 441

$$I_{pCIPRO+1.05V} = I_{pCIPRO+1.05V} - (I_{pENRO+0.93V} \times FC)$$

Equação 746

$$FC = \frac{I_{pENRO+1.04V}}{I_{pENRO+0.93V}}$$

Equação 846

$$Limite\ de\ deteção = 3 \times \frac{SD}{b}$$

Equação 569

$$Limite\ de\ quantificação = 10 \times \frac{SD}{b}$$

Equação 669

RESUMO

Um procedimento baseado na extração líquido-líquido (ELL) e separação de fases usando microextração líquido-líquido em alta temperatura induzida por sal com agitação magnética (MELL-AT-CS-AM), do inglês phase separation using magnetic-stirring salt-induced high-temperature liquid-liquid microextraction (PS-MSSI-HT-LLME) foi desenvolvido para extrair e pré-concentrar ciprofloxacina (CIPRO) e enrofloxacin (ENRO) a partir de amostras de alimentos (carne de frango e leite). Inicialmente, o procedimento usando a MELL foi usado para extrair as FQs de amostras de alimentos de origem animal, em que a diluição foi realizada para reduzir o efeito de interferências abaixo de um limite tolerável. Em seguida, utilizou-se o procedimento de MELL-AT-CS-AM adaptado que permitiu a re-extração e posterior pré-concentração dos analitos de interesse nas amostras acidificadas/ diluídas para a sua quantificação simultânea em baixo nível de concentração. Para melhorar a separação dos picos sobrepostos (na detecção simultânea), um procedimento matemático envolvendo a derivada de segunda ordem seguida da correção da linha base foi usado considerando que a voltametria de pulso diferencial foi empregada como técnica de detecção em todas as medidas. Essas alternativas permitiram determinar as FQs de interesse em amostras de alimentos de origem animal em um nível de 0,80 a 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (carne de frango), com valores de recuperação superiores a 80,5%, bem como na amostra de leite em nível de 4,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com valores de recuperação próximos de 70,0 %.

ABSTRACT

A procedure based on the liquid-liquid extraction (LLE) and followed by phase separation using magnetic stirring salt-induced high-temperature liquid-liquid microextraction (PS-MSSI-HT-LLME), was developed to extract and pre-concentrate ciprofloxacin (CIPRO) and enrofloxacin (ENRO) from food samples (chicken meat and milk). Initially, an LLE procedure was used to extract fluoroquinolones (FQs) from food samples of animal origin. The procedure allowed the extraction and dilution of the samples by bringing the interfering effect to a tolerable limit. Then, the procedure of PS-MSSI-HT-LLME was used, which allowed the re-extraction and subsequent pre-concentration of the FQs of interest, of the acidified and diluted samples, for their subsequent simultaneously quantification in low levels of concentration. To improve the separation of the overlapping peaks (in the simultaneous detection), a mathematical approach involving the second order derivative followed by the baseline correction considering that differential pulse voltammetry was employed as a detection technique in all measurements. These alternatives allowed the determine of FQs in food samples of animal origin at a level of 0.800 to 2.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (chicken meat), with recovery values higher than 80.5%, as well as in the milk sample at 4.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with recovery values close to 70.0%.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1.	Objetivo Geral	21
2.2.	Objetivos específicos.....	21
3.0	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1	Antibióticos	22
3.2	Quinolonas e Fluoroquinolonas	22
3.3	Métodos de detecção relatados nas farmacopéias	27
3.4	Métodos voltamétricos.....	29
3.4.1	Voltametria de pulso diferencial.....	30
3.4.2	Voltametria de Onda Quadrada	31
3.5	Recursos aliados as técnicas Voltamétricas	33
3.6	Utilização de Surfactantes	33
3.7	Processamento matemático das curvas voltamétricas.....	34
3.8	Planejamento e análise de experimento	35
3.9	Planejamento fatorial completo.....	37
3.10	Metodologia de superfície de resposta	38
3.11	Preparo de amostra	40
4.0	PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1	Reagentes e soluções	43
4.2	Instrumentação.....	43
4.3	Experimentos Voltamétricos	44
4.4	Aplicação da segunda derivada via correção da linha base.....	44
4.6	Coleta das amostras.....	45
4.7	Preparo das amostras	45
4.7.1.	Preparação da amostra realizada para extrair FQs (Extração direta)	45

4.7.2. Proposta de re-extração usando o método MELL-AT-CS-AM.....	46
4.8 Tratamento de dados usando o tratamento maior é melhor (MM), do inglês (Larger-the-best - LTB).....	48
4.9 Planejamento fatorial.....	49
4.10 Emprego de dispositivo para o preparo de amostra.....	50
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Eletro-oxidação de CIPRO e ENRO na superfície de eletrodo de carbono vítreo	52
5.2 Estudos Voltamétricos	54
5.2.1 Estudos dos parâmetros inerentes a VPD	55
5.2.2 Estudos dos parâmetros inerentes a VOQ.....	57
5.3 Comparação dos resultados obtidos por Voltametria de pulso diferencial e Voltametria de Onda quadrada.	60
5.4 Estudo da variação de pH do eletrólito suporte.....	61
5.5 Estudos da influência de surfactantes na resposta voltamétrica	64
5.6 Procedimentos matemáticos.....	65
5.7 Equipamento para extração.....	72
5.8 Condições de trabalho e obtenção da curva analítica	73
5.9 Preparo da amostra via microextração líquido-líquido	78
5.10 Desempenho eletroanalítico com e sem MELL-AT-CS-AM.....	85
5.11 Desempenho analítico	86
5.12 Comparação entre metodologia proposta no presente trabalho com outras metodologias propostas para a determinação de CIPRO e ENRO	89
6.0 CONCLUSÕES	93
7.0 REFERÊNCIAS	94
8.0 ANEXOS	101

1.0 INTRODUÇÃO

A terceira revolução industrial, ocorrida a partir da década de 70, foi responsável por promover uma maior interação da tríade ciência/tecnologia/indústria, o que resultou em incontáveis benefícios à sociedade por meio do desenvolvimento nas mais diversas áreas como a medicina e a indústria de fármacos. O uso de novas tecnologias proporcionou a descoberta de novas formas de diagnósticos e avanços na produção de medicamentos, os quais têm sido responsáveis não só pela melhoria na qualidade de vida da população como também no aumento da expectativa de vida (Aminov, 2010).

No entanto, este cenário de desenvolvimento frenético na indústria farmacêutica, teve como consequência a produção de uma variedade de compostos de diversas classes sem levar em conta os possíveis impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado. Diversos estudos relatam que, apesar dos incontáveis benefícios do uso de fármacos tanto em humanos como em animais, estes compostos acabam se tornando um problema ambiental devido ao acúmulo de suas formas inalteradas em ambientes naturais. (Hirsch *et al.*, 1999, Crane *et al.*, 2009, Kümmerer, 2009).

Dentre os contaminantes, que de alguma forma são descartados em ambientes naturais, destacam-se os antibióticos, hormônios e agrotóxicos. O que torna estes compostos vilões da contaminação ambiental é a elevada estabilidade quando estão no meio ambiente, sendo os ambientes aquáticos, que são importantes devido à crescente falta de água potável no mundo, os mais afetados por essas classes de contaminantes.

Atualmente o controle de fármacos é feito por agências de vigilância que utilizam as farmacopeias como fonte de pesquisa de métodos de análise. As principais

farmacopéias mundiais não oferecem nenhum método oficial para a determinação quantitativa de resíduos de Cifloxacina e Enrofloxacin em amostras biológicas complexas. Dentro desta perspectiva, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, rápidos e confiáveis, para controle de qualidade dos produtos farmacêuticos e monitoramento da concentração de drogas em alimentos e amostras de interesse socioambiental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um procedimento de extração com separação de fases baseada em microextração líquido-líquido assistida por ultrassom induzida por sal (MELL-AT-CS-AM), do inglês phase separation based on ultrasound assisted, salt-induced, liquid-liquid microextraction (PS-USLM), para a determinação de ciprofloxacina (CIPRO) e enrofloxacin (ENRO) em amostras de alimentos (frango e leite), por meio das técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e de onda quadrada (VOQ).

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar os parâmetros voltamétricos, de determinação para obter uma melhor resposta voltamétrica, tanto em intensidade de corrente de pico quanto em perfil voltamétrico, com vistas a se obter uma maior sensibilidade da técnica;
2. Aplicar método matemático que permita a separação de picos e possibilite a detecção simultânea de CIPRO e ENRO;
3. Planejamento estatístico dos experimentos utilizados na otimização dos parâmetros da extração (MELL-AT-CS-AM), com vista a diminuir o número de experimentos assim como os custos;
4. Otimização dos parâmetros experimentais da extração MELL-AT-CS-AM;
5. Aplicar o procedimento otimizado em amostras de produtos agropecuários (leite e carne de frango).
6. Comparar a metodologia proposta para a determinação de CIPRO e ENRO em amostras complexas.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibióticos

Antibióticos ou antimicrobianos são substâncias naturais, sintéticas ou semi-sintéticas que possuem capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias (Aminov, 2010). Essas substâncias estão presentes em nosso dia a dia desde que o pesquisador Alexander Fleming no final na década de 20 descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina (“Nossa capa”, 2009). Estas substâncias podem ser bactericidas, quando tem efeito mortífero sobre a bactéria, ou bacteriostático quando se interrompe a reprodução ou inibe o metabolismo.

Os primeiros bactericidas descobertos eram produzidos por fungos, como é o exemplo da penicilina. Porém devido ao amplo desenvolvimento da área existem também antibióticos sintetizados ou alterados em laboratórios farmacêuticos para evitar resistências e diminuir efeitos colaterais (Appelbaum e Hunter, 2000).

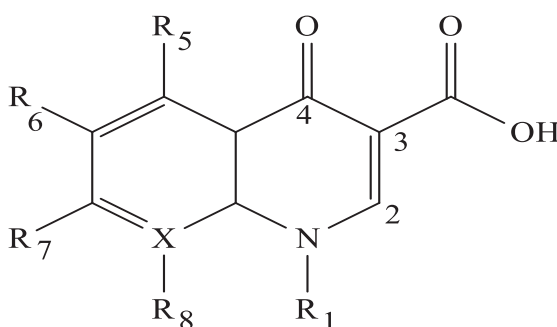
O tratamento com antibióticos requer prescrição médica e sua ingestão indiscriminadamente pode causar reações adversas. No entanto, estes medicamentos podem ser ingeridos de maneira indireta, ou seja, não intencional, por meio do consumo de água e alimentos contaminados, o que também pode provocar reações adversas, muitas vezes com efeitos potencializados pela combinação com outras espécies contaminantes presentes na natureza (“Nossa capa”, 2009).

3.2 Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas são derivados do ácido nalidíxico que pertencem à classe dos antibióticos usados no tratamento das infecções bacterianas. A evolução das quinolonas se deu na década de 60 a partir da descoberta do ácido nalidíxico, conforme Figura 1. Desde então, diversos estudos reportaram a modificação na

estrutura deste composto com objetivo de alterar as propriedades farmacocinéticas e as atividades microbianas das quinolonas (Oliveira, de e Trindade, 2016a). Os resultados mais promissores foram obtidos com a introdução do grupo piperazínico na posição 7 (R₇) e a substituição do hidrogênio por um átomo de flúor na posição 6 (R₆) do anel quinolônico Figura 1 (Golet, Alder e Giger, 2002a). Estas modificações representaram um grande avanço no combate às bactérias gram-negativas (Appelbaum e Hunter, 2000a, Bryskier e Chantot, 1995a, Naber, 2001, Zhanel *et al.*, 1999, Takemura e Hayakawa, 2001).

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido nalidíxico.



Alguns critérios são utilizados para a classificação das quinolonas (Haraguchi, 2000, Tillotson, 1996, Bryskier e Chantot, 1995b) que, em geral, são agrupados em quatro gerações (Tabela 1). As referências que tratam a respeito do tema diferem em relação aos integrantes de cada uma das famílias, de forma que as informações aqui apresentadas relatam a classificação atual e menos divergente.

Tabela 1 - Classificação da quinolonas por geração.

1ª GERAÇÃO	2ª GERAÇÃO	3ª GERAÇÃO	4ª GERAÇÃO
Ácido Nalidíxico	Norfloxacina	Levofloxacino	Gemifloxacino
Ácido pipemídico	Lomefloxacino	Sparfloxacino	Trovafloxacino
Cinoxacino	Pefloxacino	Moxifloxacino	Clinafloxacino
Flumequina	Ofloxacino	Gatifloxacino	Sitafloxacino
	Ciprofloxacino		Garenoxacina
			lemofloxacina
			flevofloxacina

As primeiras quinolonas sintetizadas, que em sua maioria não são fluoradas, acabaram por formar a primeira geração de quinolonas, com exceção da flumequina. Esses fármacos possuem um espectro de ação limitado além de uma rápida indução à resistência bacteriana.

A partir da síntese da norfloxacina com a modificação do anel quinolônico na posição 6, todas as novas quinolonas passaram a ser chamadas de fluoroquinolonas (FQs) dando início assim à segunda geração de quinolonas. Essas “quinolonas fluoradas” tiveram um considerável aumento do seu potencial no tratamento de um grande número de doenças infecciosas devido ao largo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Confrontando as capacidades bactericidas e bacteriostáticas da FQs de primeira e segunda geração, nota-se que as quinolonas de primeira geração apresentam maior tendência a produzir espécies resistentes, assim como uma menor lipossolubilidade, o que acaba por lhe conferir estreito volume de distribuição e consequentemente menor potencial farmacológico (Tillotson, 1996, Lesher *et al.*, 1962, (Appelbaum e Hunter, 2000a), Bryskier e Chantot, 1995b).

A terceira geração das quinolonas apresenta, frequentemente, aceitáveis propriedades farmacocinéticas que englobam alta biodisponibilidade, boa penetração

celular e elevado tempo de meia vida. Com exceção da lemovloxacina e flevofloxacina estas FQ's são mais ativas contra bactérias Gram-positivas, podendo ser utilizadas com maior eficácia no tratamento de infecções das vias aéreas. Apresentam também boa eficácia terapêutica em adultos nas infecções do trato urinário, aparelho respiratório, trato gastrointestinal, peles, tecidos moles, infecções articulares e ósseas assim com também doenças sexualmente transmissíveis (Haraguchi, 2000, Bush e Macielag, 2000, Bush e Macielag, 2000, Tillotson, 1996).

A quarta geração de FQs surge devido ao aumento da resistência bacteriana aos fármacos anteriormente sintetizados. A inserção de um grupo metoxi na posição R8 originou os compostos gemifloxacina e travofloxacina. Essa alteração permitiu reduzir o efluxo da célula bacteriana e aumentar a potência contra *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., resistentes a outras quinolonas (Fukuda *et al.*, 2001).

As FQs também têm sido aplicadas no tratamento de doenças como mastite, metrite, pododermatite, enterites secundárias, infecções urinárias, colibacilose, salmonelose, pasteurelose, pleuropneumonia, rinite atrófica. Sendo esses tratamentos realizados em equinos, bovinos, suínos, caninos, felinos, cuniculares e píceos (Ginsburg, Grosset e Bishai, 2003).

Diante da diversidade de aplicação desses medicamentos, e com a consequente disponibilidade devido ao crescimento da indústria farmacêutica, o uso desses antibióticos em larga escala ocasionou a contaminação de inúmeros ambientes naturais, dando assim origem a um problema global (Frade *et al.*, 2014a, Rutgersson *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2013, Zou *et al.*, 2011, Adachi *et al.*, 2013, Lillenberg *et al.*, 2010, Done e Halden, 2015, LaPara *et al.*, 2015). É importante notar que, entre 70 e 90% do que não é metabolizado permanecendo nos tecidos, ou descartado no meio ambiente.

Em outro contexto importante também salientar que de acordo com alguns trabalhos da literatura (Brown, 1996, Hernández-Arteseros, Compañó e Prat, 1998, Murillo Pulgarín, Alañón Molina e Muñoz Fernández, 2008, Ebert *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2006), pode-se concluir que a Ciprofloxacina (CIPRO) é o principal metabolito da Enrofloxacin (ENRO), (Figura 2) o que torna importante um estudo que permita a detecção simultânea de CIPRO e ENRO.

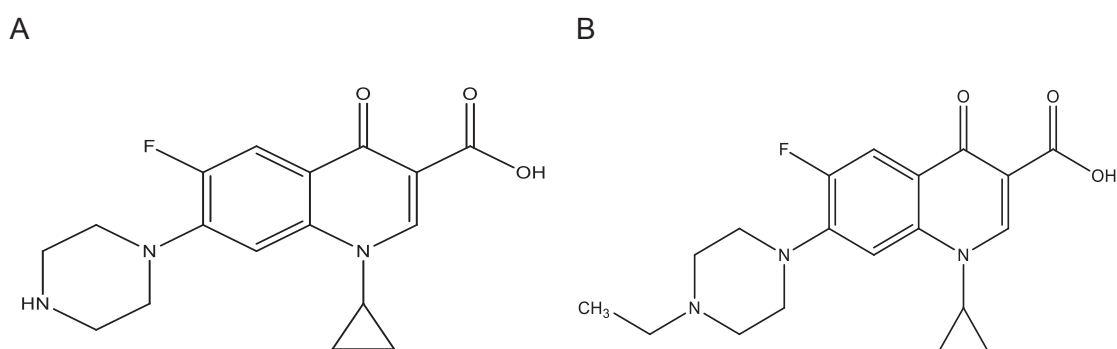


Figura 2 - Estruturas químicas de ciprofloxacina (CIPRO, A) e enrofloxacin (ENRO, B).

Estudos desenvolvidos em diversas partes do mundo (Frade *et al.*, 2014b, Rutgersson *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2013, Zou *et al.*, 2011, Adachi *et al.*, 2013, Lillenberg *et al.*, 2010, Done e Halden, 2015, LaPara *et al.*, 2015) mostram a presença de fluoroquinolonas (FQ), como também de seus metabólitos, em níveis consideráveis em amostras aquáticas e agrícolas, além de alimentos de origem animal. Também tem sido reportada a contaminação do meio ambiente por FQs decorrente das atividades da indústria farmacêutica.

Em um trabalho desenvolvido por Rutgersson e colaboradores (2014) foram realizadas análises por CLAE com detecção MS/MS, de sedimentos e águas naturais de uma região da Índia com atividade industrial farmacêutica bastante desenvolvida. Segundo os autores as fluoroquinolonas foram detectadas em amostras coletadas em até 3 Km de distância dos pontos de contato dos efluentes da indústria com o meio ambiente, o que evidencia a contaminação dos ambientes naturais por esses fármacos decorrente da atividade farmacêutica.

3.3 Métodos de detecção relatados nas farmacopéias

As especificações de qualidade dos produtos farmacêuticos, desde as matérias primas até a embalagem final, os pré-requisitos de qualidade do princípio ativo, as especialidades farmacêuticas produzidas ou usadas no Brasil e no exterior, assim como as metodologias de análises, são regulamentadas através das farmacopeias. Os trabalhos em torno dessas especificações auxiliam a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no controle de qualidade de medicamentos e insumos para saúde.

Algumas farmacopeias utilizam técnicas analíticas instrumentais simples para quantificação de princípios ativos de medicamentos à base de FQs. Os métodos oficiais recomendados pelas farmacopeias para determinação de FQs estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Técnicas analíticas recomendadas pelas principais Farmacopeias, utilizadas como referência para determinação de FQs.

Farmacopéia	Técnicas empregadas	Referências
USA	CLAE	(The United States Pharmacope, 1985)
BR	CLAE, espectrofotometria e potenciometria	(Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010)
UK	Espectroscopia (região do UV) ou potenciometria	(Pharmacopoeia, 1998)

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; UV = Ultravioleta Visível, USA= Estados Unidos da América, BR=Brasil, UK= Inglaterra.

Na farmacopeia Britânica, uma das técnicas recomendadas para controle desses fármacos é a potenciometria, técnica de baixo custo e que apresenta certas similaridades aos métodos voltamétricos, muito utilizado no controle de qualidade de fármacos e não na determinação em amostras complexas.

A Farmacopeia Britânica também recomenda que as formulações farmacêuticas sejam analisadas por espectroscopia na região do ultravioleta ou titulação potenciométrica para determinação do ácido nalidíxico, sendo este último procedimento também empregado na determinação de norfloxacin.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica indicada pela Farmacopeia Norte-Americana para análises de formulações farmacêuticas com objetivo de determinar a cinoxacina e a ciprofloxacina. De modo similar, a Farmacopeia Brasileira, Parte II da 5ª edição, disponibiliza trabalhos referentes à análise de formulações, as quais descrevem metodologias de quantificação empregando a CLAE com detecção espectrofotométrica e também os métodos potenciométricos.

Observa-se que, com exceção da potenciometria, os métodos oficiais empregados para análises de preparações farmacêuticas e monitoramento da qualidade do medicamento envolvem apenas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Essas farmacopeias não oferecem nenhum método oficial para a determinação quantitativa de resíduos desses medicamentos em amostras biológicas complexas, por não ser o interesse dos órgãos que desenvolvem esses documentos, os quais poderiam trazer resultados relevantes para o acompanhamento da toxicidade desses medicamentos tanto no meio ambiente como em indivíduos expostos a essas contaminações. Dessa forma se faz necessário o conhecimento das técnicas analíticas empregadas na detecção dessas substâncias para se obter uma proposta adequada para a detecção desses fármacos em amostras complexas.

3.4 Métodos voltamétricos

Métodos voltamétricos são técnicas eletroquímicas cujas informações qualitativas e quantitativas de determinada espécie química são obtidas a partir do registro de voltamogramas assim como curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica (Trindade e Zanoni, 2009). Para tanto aplica-se um potencial variável com o tempo para uma célula eletroquímica e medimos a corrente resultante em função desse potencial. A célula eletroquímica, na qual o experimento voltamétrico é realizado, consiste de um recipiente contendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e, geralmente, um contra eletrodo. A técnica voltamétrica mais antiga é a polarografia, e a partir desta, várias outras técnicas voltamétricas foram desenvolvidas, de modo que essas técnicas têm seus princípios fundamentais e aplicações derivados da polarografia (Silva, da, Trindade e Ferreira, 2006).

Nessa perspectiva, os métodos voltamétricos despontam como alternativas atraentes devido a vantagens como: baixo custo relativo, possibilidade de pré-concentração (exclusivo dos métodos voltamétricos), sensibilidade, rapidez de análise e simplicidade na sua execução. Além disso, são capazes de fornecer informações do mecanismo de reação e a cinética dos processos eletródicos envolvidos. Dentro desse contexto se fez necessário um estudo das técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e Voltametria de onda quadrada (VOQ) por essas técnicas serem potencialmente mais sensíveis e desta forma apresentarem um potencial de aplicação maior nas análises a serem feitas.

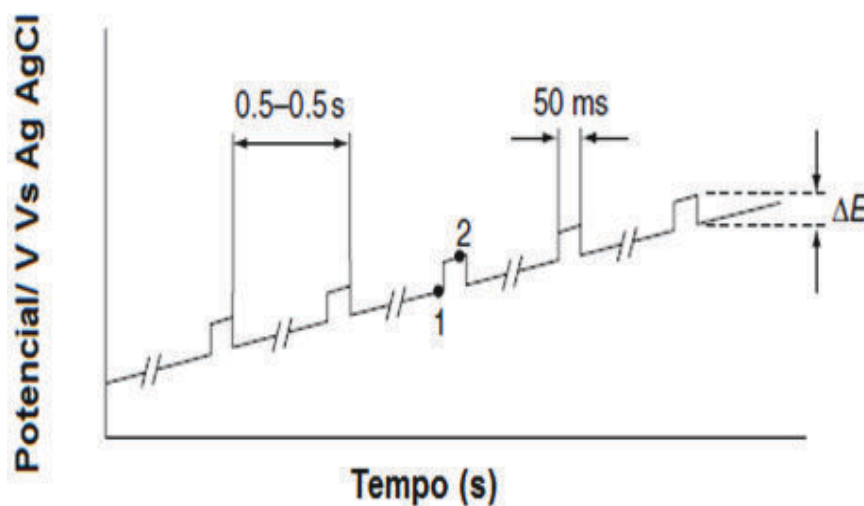
3.4.1 Voltametria de pulso diferencial

A Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) é utilizada tanto para análises quantitativas como para estudar os mecanismos, a cinética e a termodinâmica das reações eletroquímicas (Wang, 2006). A forma de pulso empregada na VPD é proveniente da polarografia de pulso diferencial (PPD). Sendo que na polarografia o potencial é aplicado na forma de pulso essa atende a requisitos do sistema eletroquímico empregado (onde o eletrodo de trabalho é um eletrodo gotejante do mercúrio). Assim a adaptação dessa forma de pulso a sistemas com eletrodos sólidos deu origem à VPD.

A VPD empregada como ferramenta eletroanalítica oferece vantagens quando comparada a técnicas eletroanalíticas (Wang, Gao, Xu, *et al.*, 2015) como Voltametria de varredura linear e Voltametria cíclica, pois a VPD apresenta elevada sensibilidade, permitindo análises diretas em níveis de ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$) e até de ppt (ng L^{-1}). A elevada sensibilidade da VPD deve-se a maneira de perturbação do eletrodo de trabalho, no qual o tempo de pulso relativamente curto e sua natureza diferencial, permite discriminar a corrente capacitiva da corrente faradaica.

O pulso empregado na voltametria de pulso diferencial é baseado em uma série de etapas de potenciais discretas ao invés de uma rampa de potencial linear. Desta forma o potencial aplicado é sobreposto a uma rampa linear, conforme demonstrado na Figura 3 (adaptada de Wang, 2006). O voltamograma de pulso diferencial é então obtido pela diferença entre as correntes medidas antes do pulso de potencial no ponto 1, e antes do final do pulso de potencial no ponto 2. Como esta é uma corrente diferencial, o voltamograma apresenta um aspecto Gaussiana, resultando em um sinal em forma de pico.

Figura 3 - Sinal de excitação para voltametria de pulso diferencial. Fonte: Wang, 2006.



3.4.2 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é utilizada tanto para análise quantitativa quanto para estudo de mecanismo, cinética e termodinâmica das reações químicas que ocorrem na superfície do eletrodo (Cobelo-García *et al.*, 2014). Quando se utiliza a VOQ como ferramenta analítica, observa-se que essa técnica também apresenta vantagens em comparação com outras técnicas eletroquímicas. A VOQ, da mesma forma que a VPD, apresenta elevada sensibilidade, permitindo análises em níveis de μgL^{-1} .

Dentre os parâmetros instrumentais que influenciam na resposta voltamétrica obtidos pela técnica de VOQ, destacam-se a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}). Com a otimização destes parâmetros, observa-se que, no decorrer de um único ciclo de potencial, a reação do eletrodo é conduzida tanto em direções anódicas como catódicas, proporcionando uma possível visão dos mecanismos das reações que ocorrem na superfície do eletrodo.

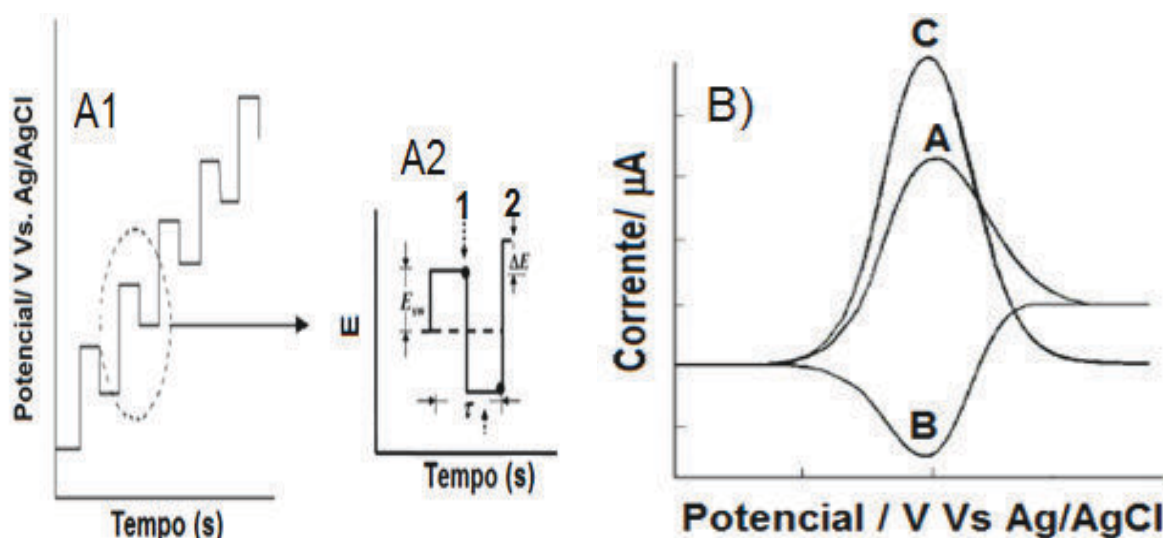


Figura 4 - (A) Forma de pulso empregada na VOQ mostrando a amplitude de potencial (E_{sw}), incremento de potencial (ΔE), Tempo de modulação T , e tempos de medição de corrente 1 e 2. B) voltamograma padrão obtido com pulso em forma de onda quadrada onde; (A) corrente direta, (B) corrente inversa, (C) corrente total. Fonte: Wang, 2006.

Dessa forma, é importante enfatizar que tanto a componente catódica como a componente anódica são plotadas em função da corrente de forma que o potencial dos dois pulsos compõe um único ciclo de potencial (Figura 4). Assim, para cada pulso de potencial, são medidos dois valores de corrente sendo que a subtração dessas correntes dá origem a corrente resultante dos voltamogramas de onda quadrada (VOQ) (Figura 4-B). Utilizando-se desta forma de pulso para o estudo da grande maioria dos mecanismos de eletródicos, obtém-se voltamogramas de onda quadrada

com características de pico o que viabiliza a determinação precisa de sua posição e altura e área.

3.5 Recursos aliados as técnicas Voltamétricas

Nos últimos anos, houve uma grande evolução das técnicas eletroquímicas em relação à instrumentação, portabilidade e miniaturização. Destaca-se ainda, a possibilidade da modificação do eletrodo de trabalho com objetivos de aumentar a sensibilidade e seletividade das técnicas durante a eletroanálise (Galli *et al.*, 2006), (Attwood e Florence, 1983). Recentemente, novas tendências têm sido exploradas como sistemas portáteis de análise em tempo real, usando eletrodos impressos, meio micelar e aplicação de métodos matemáticos na interpretação de sinais voltamétricos (Oliveira, de e Trindade, 2016).

3.6 Utilização de Surfactantes

Os surfactantes são compostos de uma parte hidrofóbica (cauda) e outra hidrofílica (cabeça), ou seja, apresentam regiões tanto polares como apolares nas suas moléculas. Dependendo da estrutura química da porção hidrofílica ligada à porção hidrofóbica, o surfactante pode ser classificado como catiônico ou, aniônico. Devido a estas características, os surfactantes apresentam capacidade de se adsorver espontaneamente sobre a superfície de diversos eletrodos de trabalho como também de se agregarem em estruturas supramoleculares, de modo que o seu uso em eletroanálise, com o objetivo de formação de um filme organizado sobre a superfície de eletrodos, já está bem documentado (Zhang, Wei e Ding, 2014). Os filmes organizados sobre a superfície de eletrodos de trabalho podem minimizar a adsorção de espécies químicas interferentes, influenciando diretamente na velocidade de transferência eletrônica, bem como no perfil e na intensidade do sinal voltamétrico. Em análise simultânea, pode propiciar o deslocamento de potenciais e ajudar na

separação de picos sobrepostos (Ensafi *et al.*, 2010). Portanto, com todas estas características vantajosas, o uso de surfactantes em eletroanálises pode auxiliar no aumento da vida útil dos eletrodos bem como na discriminação de sinais em análise simultânea.

3.7 Processamento matemático das curvas voltamétricas

No que diz respeito a análise simultânea, tanto com detecção eletroanalítica quanto por técnicas; como cromatográficas, termogravimétricas e espectroscópicas (Elsabee e Prankerd, 1992, Marbán, Vu e Valdés-Solís, 2011, Norli, Christiansen e Holen, 2010a), a utilização de métodos matemáticos para separação de sinais. Dentre estes, destacam-se as técnicas de deconvolução, primeira e segunda derivadas, as quais basicamente ajudam a aumentar a precisão e a exatidão na interpretação dos sinais.

A deconvolução apresenta-se como alternativa para a separação dos sinais sobrepostos, possibilitando a aplicação em condições em que os potenciais estão extremamente próximos. Assim, é importante para a condução e utilização da técnica como ferramenta útil no tratamento de dados eletroanalíticos, a acurácia na determinação da largura de pico, um fator importante na determinação da área do pico. Já os métodos derivativos apresentam-se como alternativa tanto para separação dos sinais eletroanalíticos como para a amplificação do sinal, garantindo uma detecção eletroanalítica extremamente precisa, mesmo com sinais de pequena expressão. Deve-se observar, porém, que nos métodos derivativos, exige-se que os potenciais de picos já estejam, pelo menos, parcialmente separados, sugerindo aliar as técnicas derivativas e de deconvolução aliadas. Assim, devido ao potencial da segunda derivada como da correção de linha base, ambas as técnicas podem ser alternativas relevantes na separação e amplificação de sinais voltamétricos.

3.8 Planejamento e análise de experimento

É sabido que existe uma infinidade de possibilidades quando se trata de métodos quimiométricos, ou seja, tratamentos matemáticos que podem ser aplicados a dados provenientes de experimentos químicos (Lavine e Workman, 2013).

Dentre esses tratamentos podemos destacar quatro vertentes:

1. Análise exploratória de dados provenientes de análises químicas com utilização da técnica de Análise de Componentes Principais (ACP), do inglês Principal component analysis (PCA), assim como Análise Hierárquica de Cluste (AHC), do Inglês Hierarchical Cluster Analysis (HCA) (Wold, Esbensen e Geladi, 1987).
2. Calibração multivariada com utilização de técnicas como Regressão de Componentes Principal (RPP), do inglês Principal component regression (PCR) e mínimos quadrados parciais do inglês Partial least squares (PLS) (Wold, Esbensen e Geladi, 1987).
3. Modelos de classificação utilizando ferramentas como: modelagem suave independente por analogia de classe (MSIAC), do inglês soft independent modeling of class analogy (SIMCA), assim como outras técnicas que seguem a mesma proposta (Vidueira Ferreira *et al.*, 2015).
4. Em meio a essas formas de tratamento matemático os sistemas de planejamento fatorial se destacam (Lundstedt *et al.*, 1998).

A metodologia da superfície de resposta tende a fornecer uma ideia do efeito geral das condições experimentais. O planejamento fatorial que permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados, oferecendo também vantagens como a redução do número de experimentos,

qualidade na interpretação dos ensaios, redução de gastos, podendo ser aplicado a várias áreas do conhecimento.

Além disso, muitos pesquisadores não contam com uma metodologia de planejamento experimental que seja ao mesmo tempo útil e simples, e estes em geral, apresentam dificuldades para escolher um modelo físico-matemático que represente de maneira adequada os fenômenos que se deseja estudar. Para a utilização do planejamento fatorial como ferramenta em um projeto experimental, deve-se dividir o trabalho em torno dos experimentos em quatro fases: definição, triagem, otimização e validação.

Na etapa de definição a investigação precisa ser definida em termos dos objetivos do estudo, ou seja, quais resposta(s) pode(m) ser medida(s) e usada(s) para melhorar a resposta alcançada no experimento e identificar os fatores que afetam essas respostas. É importante nesta fase conhecer as faixas de trabalho que podem ser aplicadas a cada uma das variáveis, o que pode ser alcançado tanto através de experimentos preliminares como através de pesquisa bibliográfica em literatura específica. O número de experimentos que podem ser realizados de forma viável (dando limites de tempo, custo, disponibilidade de reagentes etc.).

Para a determinação dos níveis a serem empregados a cada uma das variáveis deve-se executar basicamente dois experimentos para cada uma das variáveis- um com todas as variáveis nas configurações mais baixas e um com todos eles em suas configurações mais altas, conforme equação 2^n . Se os resultados dos dois estiverem próximos, então (provavelmente) indica que o domínio é muito estreito e o alcance das variáveis precisa ser aumentado. Assim, com estes experimentos pode-se ter ideia da configuração que deve ser empregada ao planejamento fatorial.

Na etapa de triagem o objetivo é determinar qual das variáveis afeta significativamente a resposta, sendo extremamente importante para se avançar para a metodologia da superfície de resposta. Cada uma das variáveis pode ter um valor alto ou baixo, sendo então um projeto fatorial de dois níveis, onde um projeto fatorial completo terá experiências com todas as combinações das variáveis em suas duas configurações. Assim, se houver variáveis n , o número total de possíveis combinações de configurações (e, portanto, o número total de experiências) é 2^n .

Este método tem a desvantagem de exigir tempo para analisar o efeito de cada variável e a falta de análise das interações entre todas as variáveis.

3.9 Planejamento fatorial completo

O design fatorial e a metodologia da superfície de resposta possuem vantagens sobre os métodos univariados, em que esses métodos são usados não só para que se encontre o melhor, mas também pode ser usado para examinar como os fatores interagem e quais condições são as mais cruciais. Sendo uma ferramenta estatística empregada na pesquisa científica que permite investigar variáveis experimentais combinadas e analisar as suas respostas individuais, assim como o efeito que uma variável exerce sobre outra com um reduzido número de experimentos.

Para estabelecer o número de experimentos a ser realizado é utilizado a relação, 2^n , onde n é o número de variáveis. Na proposição dos experimentos as variáveis são combinadas em dois níveis para cada variável, sendo um nível máximo (+1, valor codificado) e um nível mínimo (-1, valor codificado). Os valores codificados para os níveis +1 e -1 são dependentes da variável a ser analisada, de forma que, os critérios da faixa de trabalho a serem estudadas são definidos através de estudos preliminares ou até mesmo de pesquisa bibliográfica (Tranos, Reggiani e Nijkamp, 2013).

Os dados obtidos a partir das respostas médias são aplicados a uma matriz de contraste (gráfico de Pareto), na qual os efeitos da coluna são dados pelas equações 1 e 2, onde, n é o número de ensaios, y_i são as observações individuais, $y_i (+)$ e $y_i (-)$ são as respostas médias das observações no nível +1 e -1.

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

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

A equação 1 é aplicada para o efeito da média de todas as observações, enquanto que a equação 2 é aplicada para o efeito das variáveis e interações usando a diferença entre os níveis +1 e -1.

3.10 Metodologia de superfície de resposta

Os métodos de superfície de resposta (MSR) são uma forma de se explorar os efeitos das condições de operação na variável de resposta, onde ao mapear a superfície de resposta pode se obter uma condição ótima para as variáveis envolvidas no processo. Normalmente são empregados inicialmente experimentos fatoriais, de forma que esses indicam quais fatores influenciam mais no sistema e em que níveis são essas influências. Assim a medida que se obtêm essas informações esses experimentos são substituídos por *designs* melhores que se aproximam mais das condições ótimas. Dessa forma a MSR se mostra uma ferramenta que descreve como devemos executar esses conjuntos sequenciais de experimentos, como também fornece alternativas para a obtenção de condições ótimas.

A aplicabilidade da MSR está na capacidade de utilizar modelos matemáticos empíricos para descrever o modelo de funções polinomiais lineares ou quadráticas. Assim para um modelo onde se pretende otimizar a relação entre duas variáveis a

matrix de Doehlert é uma alternativa, sendo uma variável é estudada em cinco níveis, enquanto a outra é estudada em apenas três níveis, conforme ilustra a Figura 5. Diferentes critérios podem ser usados para atribuir os fatores. Como regra geral, é preferível escolher a variável com o efeito mais forte como o fator com cinco níveis, a fim de obter a maior parte das informações do sistema.

A definição de cada projeto é realizada considerando o número de variáveis a se otimizar e a relação entre os valores codificados (C_i) da matriz experimental com os valores reais. A relação entre valores codificados e reais é dada por:

$$C_i = X_i - X_i^0 \quad \Delta X_i \alpha$$

Onde C_i é o valor codificado para o nível do fator i , X_i é seu valor real em um experimento, X_i^0 é o valor real no centro do domínio experimental, ΔX_i é a etapa de variação do real valor e α é o limite de valor codificado para cada fator. O número de experimentos requeridos (N) é dado por:

$$N = K^2 + K + C_0$$

$N = k^2 + k + C_0$, onde K é o número de variáveis e C_0 é o número de pontos centrais. Os replicados no nível central das variáveis são executados para validar o modelo por meio de uma estimativa da variância experimental.

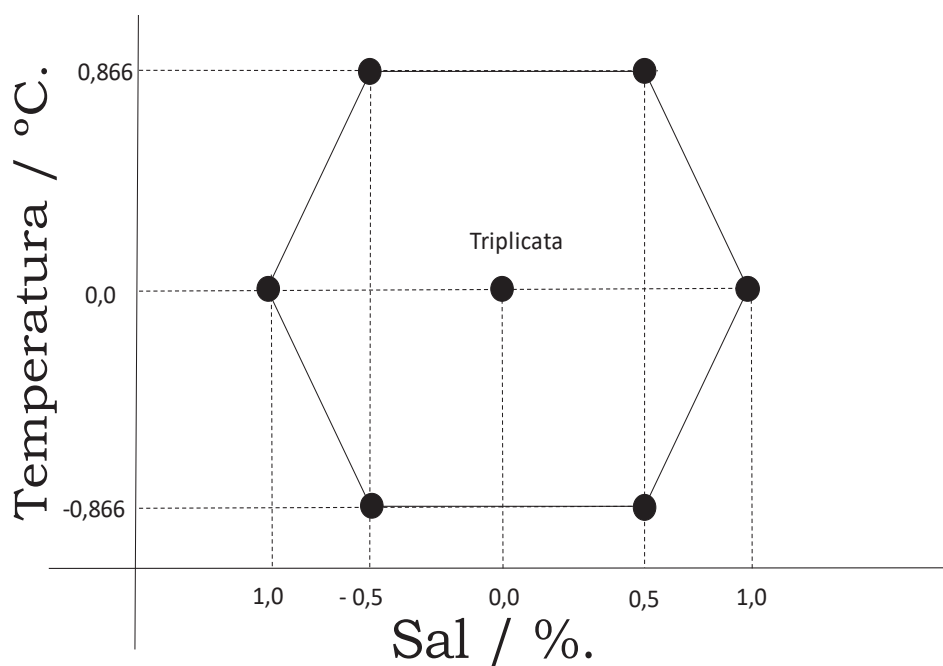


Figura 5 - Ilustração da matriz Doehlert com duas variáveis empregadas.

3.11 Preparo de amostra

A determinação eletroanalítica tem se mostrado amplamente valiosa quando se trata da determinação de fármacos e, devido às características da técnica, tem sido amplamente aplicada em formulações farmacêuticas. No entanto, quando se trata de amostras biológicas complexas (leite e carne de frango), a técnica apresenta limitações que impossibilitam a determinação sem um preparo de amostra eficaz (Golet, Alder e Giger, 2002b). Neste contexto, mesmo com inúmeros avanços em eletroanálises, pouco tem sido relatado sobre o preparo de amostra de amostras complexas para determinação eletroanalítica.

Sendo assim, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinações quantitativas de contaminantes em: água proveniente de ambientes naturais (Wang, Gao, Xu, *et al.*, 2015), amostras biológicas (Wang, Gao, Wang, *et al.*, 2015), e alimentos (Yang *et al.*, 2016) têm despertado interesse da comunidade científica.

Em amostras mais complexas como aquelas provenientes de ambientes aquáticos, tecidos animais e amostras de solos, o nível de interferência é maior, de

forma que, no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, a matriz pode apresentar níveis significantes de interferentes, sendo imprescindível o preparo de amostra uma vez que problemas como inativação da superfície do eletrodo por interferentes ou até mesmo sobreposição dos sinais dos interferentes com os sinais eletroanalíticos dos analitos podem impossibilitar a detecção (Gorla *et al.*, 2016).

Novas e variadas abordagens têm sido empregadas de forma a solucionar esses problemas, onde técnicas como: microextração por adsorvente embalado do inglês *microextraction by packed sorbent* (MEPS), extração por agitação em barra magnética do inglês *fabric phase sorbent extraction* (FPSE), polímero molecularmente impresso, do inglês *Molecular imprinted polymer* (MIP), assim como outras técnicas que combinam a extração em meio sólido e líquido combinadas com dispositivos que possibilitam uma boa performance a essas técnicas aumentando a eficiência e a recuperação do analito (Yang *et al.*, 2016).

A microextração líquido-líquido (MELL), dentre as técnicas recentes de preparo de amostra, tem recebido considerável atenção (Rezaee *et al.*, 2006). O potencial desta técnica foi desenvolvido com a introdução de um solvente dispersor na combinação extrator e amostra, na qual pode-se diminuir a quantidade de solvente extrator sem prejudicar a recuperação dos analitos de interesse (Share, 1976). A partir deste conceito de extração, diversas adaptações têm sido feitas na MELL, que incluem: (i) uso de ultrassom para facilitar a formação de microgotas (Dimpe e Nomngongo, 2016, Nováková e Vlčková, 2009), (ii) adição de sais para aumentar a separação entre as fases aquosas e orgânica, (iii) uso de líquidos iônicos como solventes extratores e, principalmente, (iv) substituição de solventes orgânicos tóxicos (Kokosa, 2015, Jain e Verma, 2011, Kokosa, 2013).

A implementação dessas técnicas pode variar amplamente, mas os recursos básicos empregados para extração permanecem os mesmos, incluindo o uso de apenas uma pequena quantidade de solventes orgânicos e uma alta proporção de volume amostra-aceitador. A fase orgânica, que extrai e pré-concentra o(s) analito(s), pode ser usada diretamente por algumas técnicas, porém para a detecção eletroanalítica é necessário a evaporação desse solvente e redissolução em eletrólito.

Os procedimentos e dispositivos empregados na extração (e limpeza) para análises quantitativas em matrizes complexas com detecção eletroanalítica também têm o objetivo de reduzir o tempo de manipulação das amostras, diminuir o uso de solventes não tóxicos, de acordo com os conceitos de Química Verde (QAV).

Com o objetivo de superar as limitações das técnicas eletroanalíticas como técnica de detecção em amostras complexas, neste trabalho foi desenvolvido um procedimento com base na microextração líquido-líquido em alta temperatura, induzida por sal (MELL-AT-IS-US) (Fernández *et al.*, 2013) um dispositivo integrado para se obter uma separação satisfatória e rápida das fases orgânicas e aquosa.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

CIPROFLOXACINA e ENROFLOXACINA foram adquiridas de 99% (Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil) e as soluções padrão foram preparadas ao nível de concentração de $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ por dissolução em 0,05% de ácido acético (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) e posterior diluição em água ultrapura. O ácido acético, ácido fosfórico, acetato de sódio e ácido bórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). Como eletrólito suporte foram usados: tampão acetato e soluções de tampão Britton-Robinson (BR). Para ambas as soluções tampão, a concentração foi de $4,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e os valores de pH foram ajustados utilizando ácido clorídrico ou hidróxido de sódio (ambos da Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) preparados na concentração de $1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

O tensoativo lauril sulfato de sódio foi adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) e preparados com água ultrapura ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

4.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando o potenciostato / galvanostato PGSTAT 204 (Metrohm Autolab®, Utrecht, Holanda), controlado pelo software Nova 1.11. A célula eletroquímica, com capacidade de 5,0 mL, foi composta por três eletrodos convencionais: eletrodo auxiliar fio de Pt em espiral, eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl}_{\text{sat.}}$) e eletrodo de carbono vítreo (ECV), como eletrodo de trabalho. Antes da utilização, o eletrodo de trabalho (ECV) foi cuidadosamente polido com pasta de alumina (1,0 e 0,30 μm) sob almofada de polimento e enxaguado com água ultrapura. O procedimento foi repetido cuidadosamente em todas as medições subsequentes. A água ultrapura ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), utilizada na limpeza de vidrarias e preparação de todas as soluções químicas, foi obtida em um purificador de água de

osmose reversa OS 10 LTXE (Gehaka®, São Paulo, Brasil) e ulterior purificação em sistemas Thermo Scientific® Modelo Smart2Pure (San Jose, EUA). Todas as medições e / ou ajustes de pH foram realizados utilizando um eletrodo de vidro combinado (Hanna®, modelo HI 1131B, Texas, Estados Unidos) ligado a um medidor de pH digital (Hanna®, modelo HI 3221, Texas, Estados Unidos). Para agitação e homogeneização utilizou-se o agitador magnético (Fisatom®, modelo 701, São Paulo, Brasil).

4.3 Experimentos Voltamétricos

Os estudos iniciais empregando o eletrodo de carbono vítreo (ECV), foram realizados transferindo-se 5,00 mL, da solução do eletrólito suporte tampão Britton Robinson BR para a célula eletroquímica e submetendo-a a agitação por 10 segundos. Em seguida, foram registradas as medidas voltamétricas, mediante varredura em um intervalo de potencial pré-estabelecido.

Depois de registradas as medidas para o eletrólito suporte, uma alíquota da solução estoque da(s) fluoroquinolona(s) e/ou surfactante foi adicionada na célula, registrando os voltamogramas, conforme o mesmo procedimento citado acima.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata e em todo trabalho, os resultados apresentados equivalem à média aritmética dessas medidas.

4.4 Aplicação da segunda derivada via correção da linha base

Para melhorar a resolução do pico na detecção simultânea, o método derivado de segunda ordem corrigido pela linha de base foi usado e processado tanto pelo software Originlab® (versão 8.5) quanto pelo software Nova 1.11 (Metrohm Autolab®), com o objetivo de melhorar a separação dos picos bem como precisão nas medidas da intensidade de corrente de pico.

No software NOVA 1.11 (programa de gerenciamento do equipamento Metrohm Autolab®), o procedimento foi realizado inserindo automaticamente a função derivativa nos valores de corrente e potencial da técnica de VPD e VOQ.

No software Origin®, antes do procedimento de segunda derivada foi aplicado a função “*smoothed*”, de acordo com o algoritmo de Savitsky-Golay, para discriminação dos ruídos de rede e melhor definição do sinal. Em seguida, aplicou-se a função derivativa de segunda ordem, obtendo a segunda derivada do potencial em função da variação da corrente. Da mesma forma foi realizado o procedimento de correção da linha base antes e após à aplicação da segunda derivada utilizando o software Origin®.

4.6 Coleta das amostras

As amostras comerciais de leite e frango foram adquiridas na cidade de Dourados, MS, Brasil. Tais amostras foram armazenadas em frascos âmbar, estocadas em temperatura de 4,0 °C, para posterior análise. Todos os frascos e vidrarias usados foram imersos em solução de ácido nítrico 10%, por 12 horas, para limpeza e, a seguir, lavado três vezes com água ultrapura.

4.7 Preparo das amostras

4.7.1. Preparação da amostra realizada para extrair FQs (Extração direta)

Primeiramente foram adicionados às amostras de leite e carne de frango quantidades conhecidas das soluções padrão de CIPRO e ENRO. Para avaliar a eficiência da extração de FQs em amostras de alimentos, o procedimento foi desenvolvido, como mostrado na Figura 6 seguida de eletroanálise direta. Como solventes extratores foram avaliados solução aquosa 0,70 mol L⁻¹ de HCl e o tampão Britton-Robinson (4,0x10⁻² mol L⁻¹, pH 3,00 - 9,00). A Figura 6 (passo I) mostra a

extração realizada, em que foram colocados em tubos cônicos 0,40 g de carne de frango ou amostra de leite contendo entre 0,80 e 4,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO. Em seguida, adicionou-se solvente extrator (acetona) e agitou-se por vórtice durante 30 s (Figura 6II). Posteriormente, retiraram-se 5 mL do sobrenadante da (Figura 6III) e submetidos à eletroanálise direta sem qualquer outro tipo de tratamento (Figura 6IV).

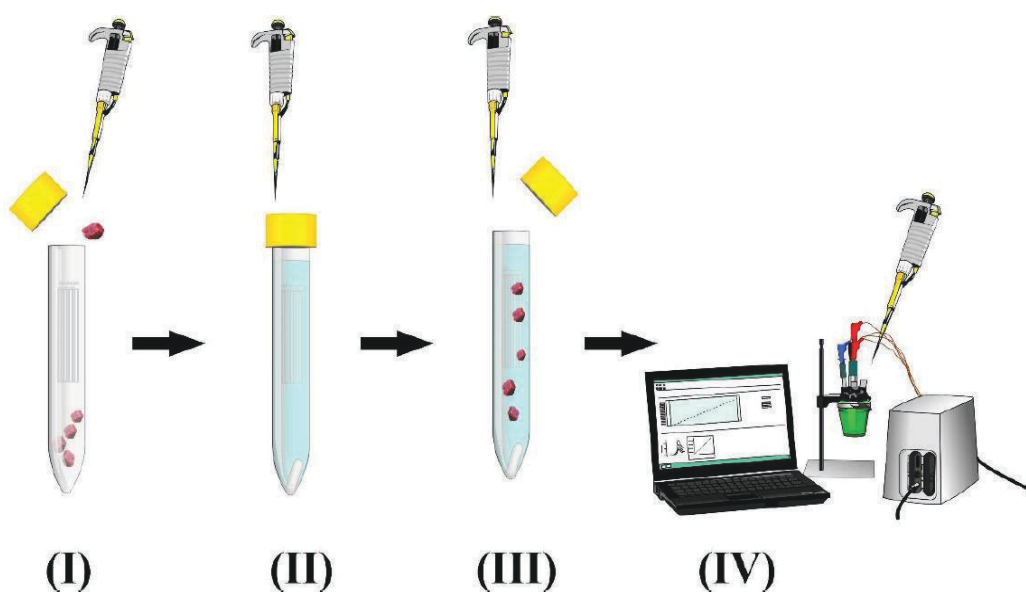


Figura 6 - Esquema do procedimento de extração para a detecção direta.

4.7.2. Proposta de re-extração usando o método MELL-AT-CS-AM

O procedimento MELL-AT-CS-AM, desenvolvido de acordo com o procedimento (MLL-ISAUS) (Fernández *et al.*, 2013), sendo que fatores como: tipo e o volume do solvente extrator, força iônica pela adição de sal, pH da amostra, temperatura e tempo de extração foram variáveis otimizadas de modo que a otimização dessas variáveis é de suma importância.

O procedimento de extração proposto pelo presente trabalho foi realizado conforme ilustrado na Figura 7, no qual primeiramente foram colocados 0,40 g de amostra de carne de frango ou leite com 0,80 e 4,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO em tubos falcon e agitados em vortex por 3 minutos, realizado como descrito na Figura 7

(passo I e II). Depois de realizado o passo I a II (Figura 7), 8 mL do sobrenadante foram removidos e adicionados em outro tubo cônico (capacidade 15 mL) para o ajuste no valor de pH para 7,0, usando HCl ou NaOH (Figura 7 passo VII). Posteriormente, foi ajustada a força iônica pela adição de KCl (quantidade variada entre 20,0 a 30%, m / v). Seguido de agitação manual ou vortex até a dissolução total do sólido (Figura 7, passo IV). Em seguida, adicionou-se a acetona (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) como solvente extrator nos tubos cônicos (com a porcentagem variando entre 30,0 e 37,5%, v/v) e as amostras foram submetidas ao agitador magnético sob aquecimento à temperatura entre 60 e 70 °C durante tempo variável de 10 e 20 min, respectivamente (Figura 7, passo V). Após este passo, o sobrenadante que contém a acetona (fase enriquecida) foi coletado com uma micropipeta (Hamilton, São Paulo, Brasil) e adicionada em béquer, (Figura 7, passo VI). A fase orgânica enriquecida foi seca em uma estufa de laboratório a 40 °C por 30 min. O resíduo foi dissolvido reconstituído em um tubo Eppendorf com 5,0 mL da solução de eletrólito de suporte (tampão BR a pH 4,0) (Figura 7, passo VII), em ultrassom durante 10 s e a determinação eletroquímica foi realizada usando o método de adição padrão (Figura 7, Passo VIII).

Todas as amostras de carne utilizadas foram previamente cortadas em minúsculos pedaços em forma de cubos, com o objetivo de aumentar a área de contato e promover uma extração mais eficiente.

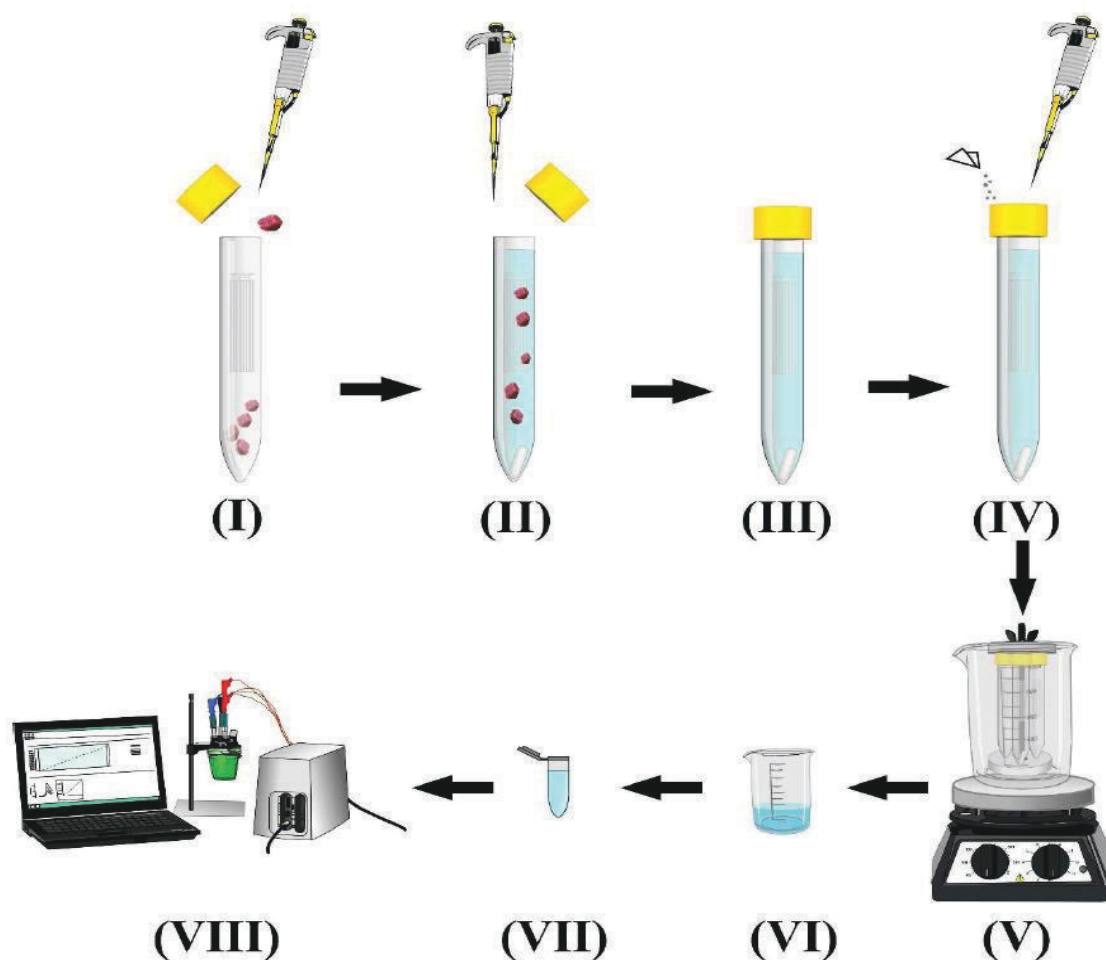


Figura 7 - Esquema para o procedimento MELL-AT-CS-AM.

4.8 Tratamento de dados usando o tratamento maior é melhor (MM), do inglês (Larger-the-best - LTB)

Na abordagem de otimização de múltiplas respostas, utilizada para maximizar as respostas analíticas do ENRO e do CIPRO, o método aplicado foi baseado em maior é melhor (MM), onde o resultado foi expresso em termos de desejabilidade individual (di), como descrito na equação 3 (Gorla *et al.*, 2016b). A Tabela 8 mostra os fatores estudados e seus níveis de variação, bem como os resultados do projeto fatorial completo.

$$di = \left(\frac{y - L}{H - L} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde, o y é o principal resultado experimental obtido relacionado à intensidade de pico de intensidade (I_p), L e H são os valores mais baixos e mais altos, respectivamente, obtidos para o I_p obtido para o conjunto de experiências. Além disso, foi calculado a desejabilidade geral (Di) pela média geométrica do di (equação 4).

$$Di = \sqrt[m]{d_1^{p1} d_2^{p2} \dots d_n^{pn}} \quad \text{Equação 4}$$

A partir da equação 4, m é o número de respostas estudadas para cada experimento durante o processo de otimização e dn é o peso de cada resposta. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote de software Stat Soft Statistica® 10.0 (Stat soft, Tulsa, EUA). Em todos os métodos, utilizou-se um nível de confiança de 95%.

4.9 Planejamento fatorial

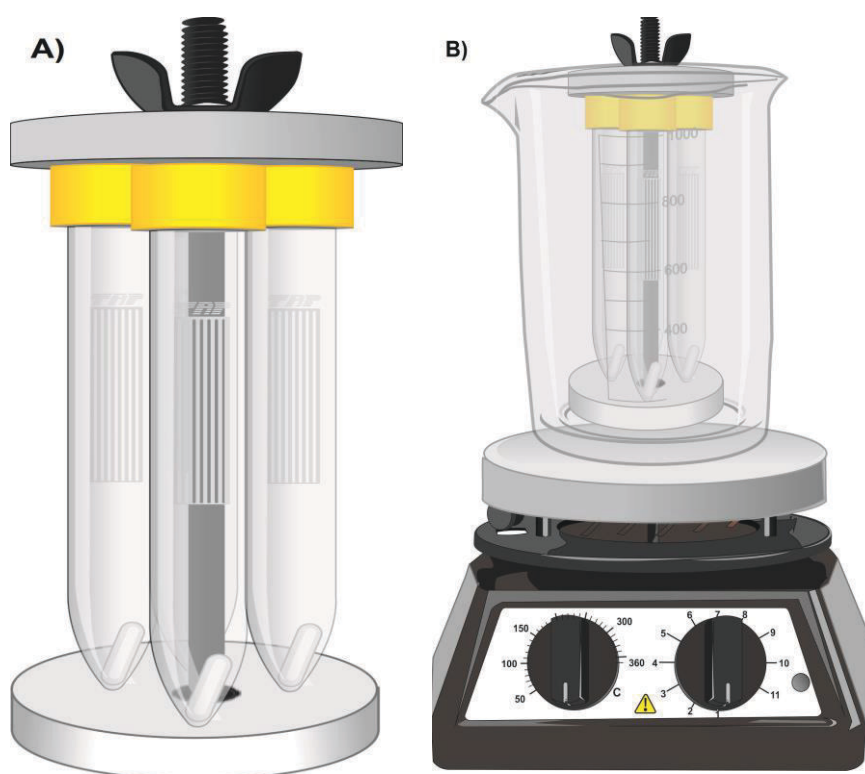
Para otimizar o procedimento de extração via MELL-AT-CS-AM, utilizou-se o planejamento fatorial 2^5 , estudando, em duplicata, as seguintes variáveis: HCl (0,70 - 1,00 mol L⁻¹), tempo de agitação (10 - 20 min), o volume de solvente (12,5 - 25% v / v), massa de KCl (20-30%) e temperatura (60 - 70 °C). As análises do planejamento fatorial foram interpretadas através de diagramas de Pareto e os resultados mais significantes foram estudados na matriz Doehlert, sendo os ensaios realizados de forma aleatória com ponto central realizado em triplicata. A resposta analítica foi obtida em termo de recuperação para as FQs, CIPRO e ENRO. O tratamento estatístico foi realizado pelo software Statistica 10.0 (StatSoft Statistica®, Tulsa, Estado Unidos), empregando 95 % de confiança. Os resultados foram obtidos com três medidas experimentais, sendo demonstrado pela média e o respectivo desvio padrão.

4.10 Emprego de dispositivo para o preparo de amostra.

Na seção experimental 4.7.2 é demonstrado na Figura 7, passo V a utilização de um dispositivo para essa etapa da extração. O uso de dispositivos facilitadores à extração não é uma novidade tendo sido relatado por (Fernández *et al.*, 2013) a utilização desses dispositivos nas etapas de extração com o objetivo de otimizar a extração.

No presente trabalho a utilização de um dispositivo se tornou não só desejável como também se mostrou imprescindível. A Figura 8A apresenta do dispositivo empregado e a Figura 8B ilustra o equipamento no ambiente onde é realizada a extração, ou seja, em um béquer com água a temperatura controlada, tendo em seu interior barras magnéticas para agitação do meio, sobre uma chapa de aquecimento.

Figura 8 - Equipamento utilizado para executar o passo de extração de CIPRO e ENRO nas amostras



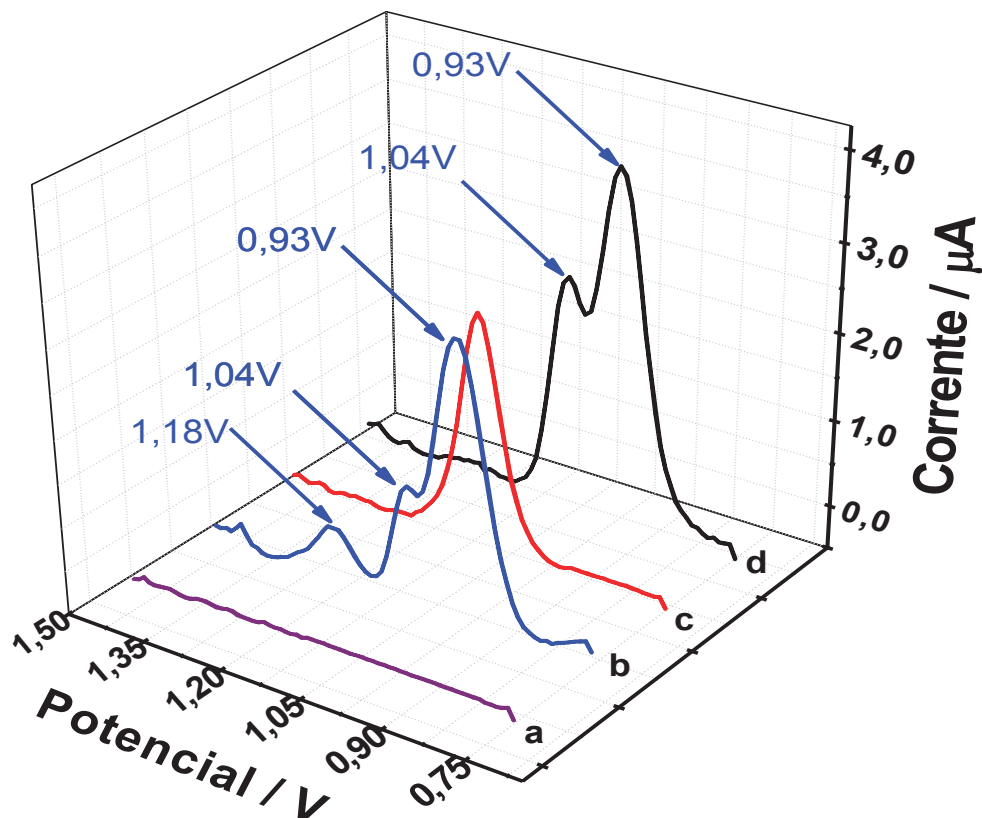
O dispositivo empregado foi feito em teflon tendo vantagens como design simples, baixo custo, praticidade, material resistente, aplicação repetitiva e facilidade de operação.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eletro-oxidação de CIPRO e ENRO na superfície de eletrodo de carbono vítreo

Na Figura 12 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos na ausência de CIPRO e ENRO (voltamograma a), assim como na presença de CIPRO e ENRO (Figura 12 b-d) à concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de para detecção individual e simultânea na superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV). A detecção individual de ENRO (Figura 12 b), $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ é caracterizada pela presença de três picos de oxidação distinguíveis; o primeiro em 0,93 V, o segundo em 1,04 V e o terceiro em 1,18 V vs. Ag / AgCl_(KCl sat). No entanto, o segundo pico (em 1,04 V) aparece muito próximo do pico da CIPRO (voltamograma c), uma vez que o pico de oxidação ocorre em 1,05 V vs. Ag/AgCl_(KCl sat) e, neste caso, compromete a detecção simultânea de ambas as FQs. Essa sobreposição de sinais fica bem elucidada na Figura 12 (voltamograma d), onde a eletroanálise simultânea de ambos as FQs (tendo grupo eletroativo semelhante) propicia a formação de picos sobrepostos 1,05 V vs. Ag / AgCl_(KCl sat), dificultando a medição precisa da intensidade da corrente de pico. (Ensafi *et al.*, 2010) também verificaram o mesmo fenômeno e apresentaram alternativas que possibilitam a eletroanálise simultânea de CIPRO e ENRO.

Figura 9 - Voltamogramas de pulso diferencial (com correção de linha base) registrados em ECV para: (a) em branco: tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) como eletrólito de suporte e eletro-oxidação individual de (b) ENRO e (c) CIPRO, bem como para a mistura de ambos os FQs (d) todos em $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Condições: Incremento de potencial (ΔE_s) = 10 mV, amplitude de pulso (ΔE) = 75 mV, tempo de pulso = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms. Eletrodo de referência Ag / AgCl_(KCl sat.).



Sabendo que os mecanismos de eletro-oxidação são basicamente os mesmos devido às semelhanças estruturais entre as moléculas de CIPRO e ENRO, infere-se que somente variáveis termodinâmicas e cinéticas podem influenciar os processos de eletro-oxidação

Dentro desse contexto, a sobreposição dos picos voltamétricos mesmo quando permitem a separação dos sinais diminuem consideravelmente a precisão das medidas. Dessa forma a deconvolução e / ou o método derivado de segunda ordem, como também o método derivado de segunda ordem com correção da linha de base podem ser alternativas não só para a separação dos sinais voltamétricos como também para a determinação simultânea (Elsabee e Prankerd, 1992, Norli,

Christiansen e Holen, 2010a). A estratégia de processamento matemático deve ser aplicada apenas quando houver picos parcialmente sobrepostos possibilitando a determinação da proporção de interferência de um pico sobre o outro. Dessa forma se verificou que o pico ENRO (em 1,04 V), mesmo com a diversas otimizações eletroanalíticas permaneceu sobreposto ao pico principal da CIPRO. Uma alternativa atrativa é a aplicação dos modelos matemáticos frequentemente usados em técnicas de amperometria pulsada. Dessa forma para se obter a discriminação entre os sinais da FQs aplicou-se os valores de I_{pCIPRO} de CIPRO e ENRO às equações 7 e 8 (Silva, *et al.*, 2011).

$$I_{pCIPRO+1.05V} = I_{pCIPRO+1.05V} - (I_{pENRO+0.93V} \times FC) \text{Equação (7)}$$

$$FC = \frac{I_{pENRO+1.04V}}{I_{pENRO+0.93V}} \text{Equação (8)}$$

Em que, o I_{pCIPRO} é a corrente de pico medida para CIPRO a 1,05 V, I_{pENRO} é a corrente de pico medida para ENRO a 1,04 V e 0,93 V (ambos obtidos experimentalmente) e FC é o fator de correção obtido através da relação de I_{pENRO} em 1,04 V / 0.93 V. O método proposto não tem pretensão de transformar o sinal eletroanalítico, mas sim efetuar a subtração do sinal da ENRO que interfere sobre o sinal da CIPRO.

5.2 Estudos Voltamétricos

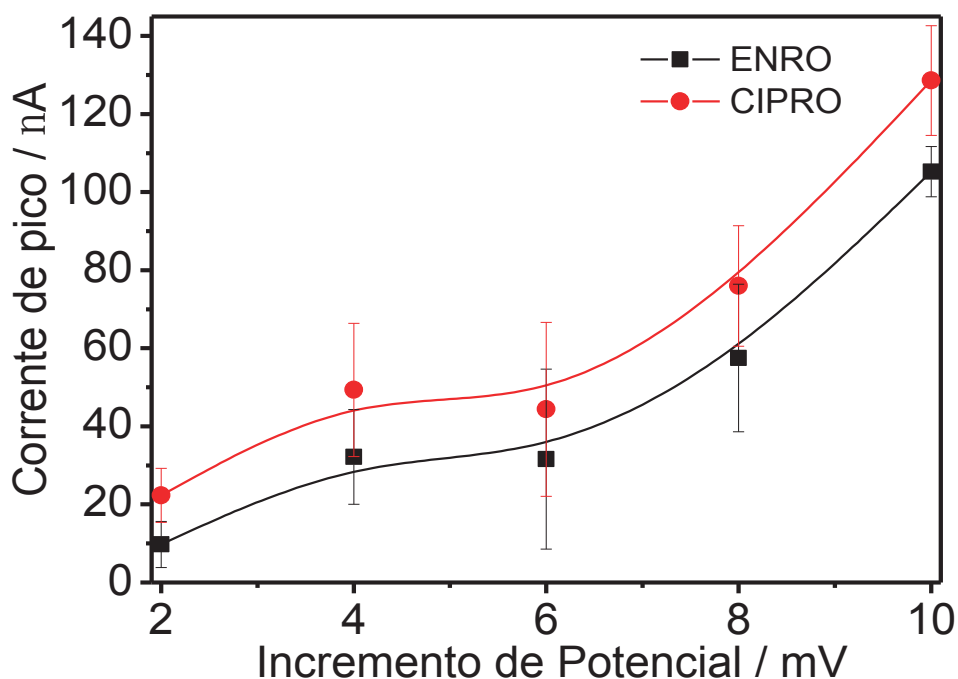
A seletividade e a sensibilidade de um método voltamétrico podem ser melhoradas através do ajuste dos parâmetros instrumentais. Dentro desse contexto foram otimizados os parâmetros das técnicas eletroanalíticas: voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). De forma que os parâmetros instrumentais foram otimizados para fornecer a melhor combinação entre a resolução,

avaliada pela largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) e a corrente de pico de oxidação das fluoroquinolonas CIPRO e ENRO.

5.2.1 Estudos dos parâmetros inerentes a VPD

As melhores condições dos parâmetros instrumentais: tempo de modulação (ms), amplitude de modulação (ms) e incremento de potencial (mV) da VPD foram investigadas. O incremento de potencial foi variado de 2 a 10 mV (Figura 13), com o objetivo de verificar a influência do potencial sobre a corrente de pico, pois fora dessa faixa de variação ocorre um aumento considerável de ruídos no sinal analítico. Como pode ser observado na Figura 13, ocorre um aumento na corrente de pico anódica de 2 a 10 mV, refletindo em um aumento de sua intensidade.

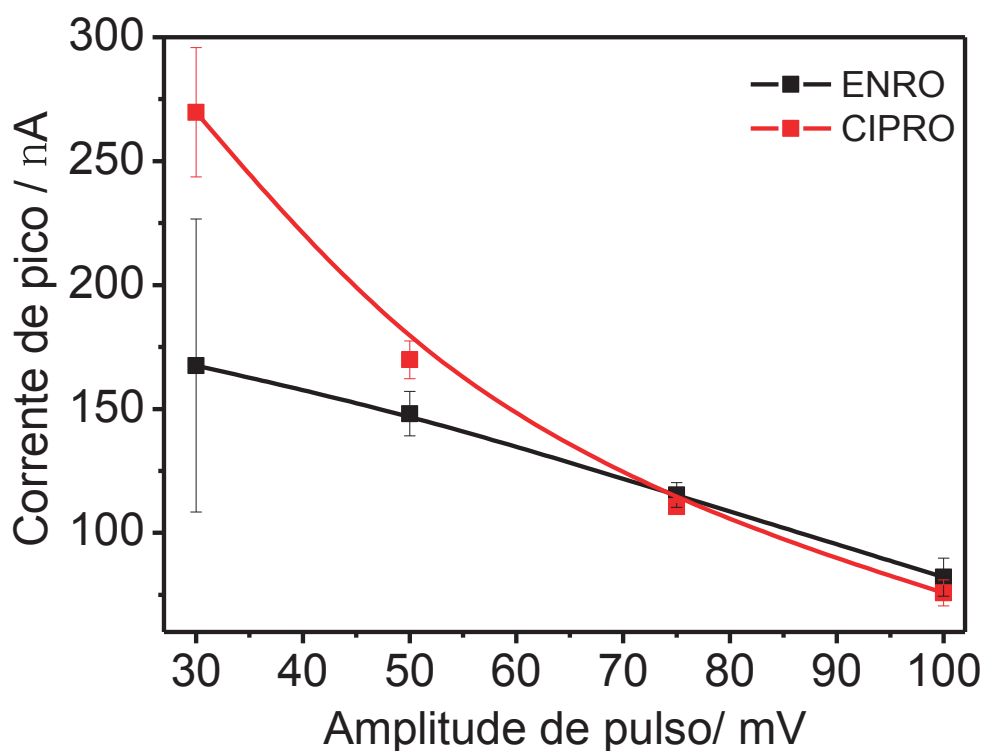
Figura 10 - Influência da variação do Incremento de potencial sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.



Assim, foi escolhido o valor de 10 mV por apresentar melhor relação entre a sensibilidade e a resolução assim como manter a separação entre os potenciais de oxidação das FQs.

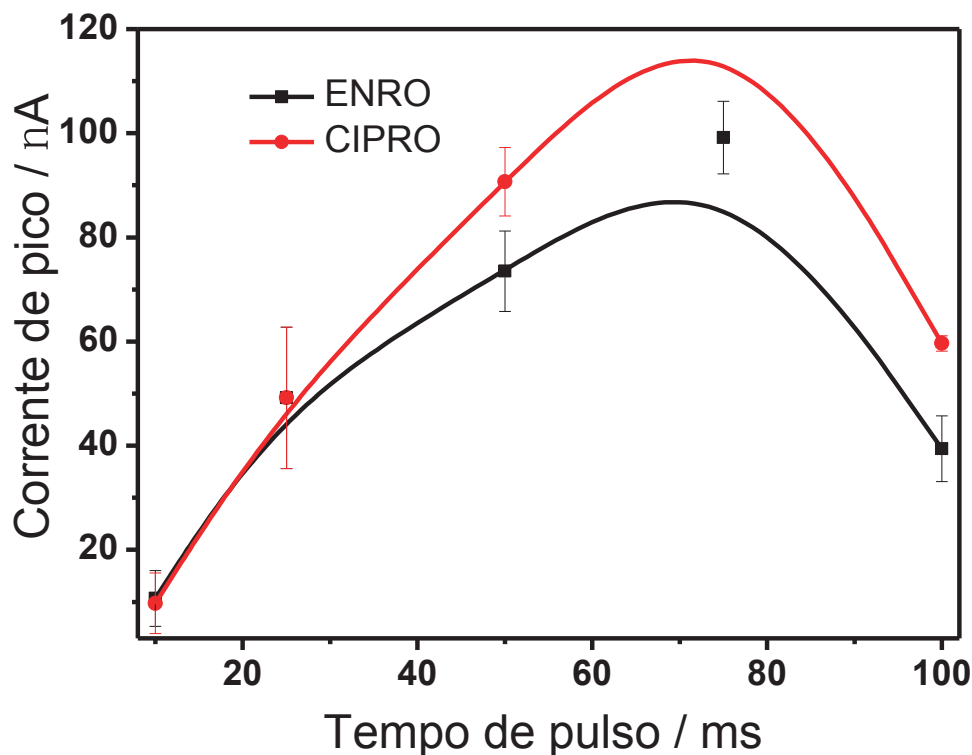
Tendo estabelecido 10 mV como incremento de potencial outras variáveis foram estudadas de modo que a amplitude de modulação foi variada entre 30 e 100 mV o intervalo de modulação entre 10 e 100 ms e o tempo de modulação entre 10 e 100 ms.

Figura 11 - Influência da variação da amplitude de modulação sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.



Os intervalos de variação bem como os valores otimizados são apresentados na Tabela 3 e as Figuras 14 e 15, apresenta a forma como variaram as I_{pa} das FQs em função da variação desses parâmetros.

Figura 12 - Influência da variação do tempo de modulação sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.



da variação desses parâmetros.

Tabela 3 - Parâmetros instrumentais otimizados para detecção simultânea de CIPRO e ENRO.

Técnica de pulso	Parâmetro	Intervalo	Valor
		testado	estabelecido
DPV	Incremento de potencial ΔE_s / mV	2 – 10	10
	Amplitude de pulso / ms	30 – 100	50
	Tempo de modulação/ ms	10 – 100	70

5.2.2 Estudos dos parâmetros inerentes a VOQ

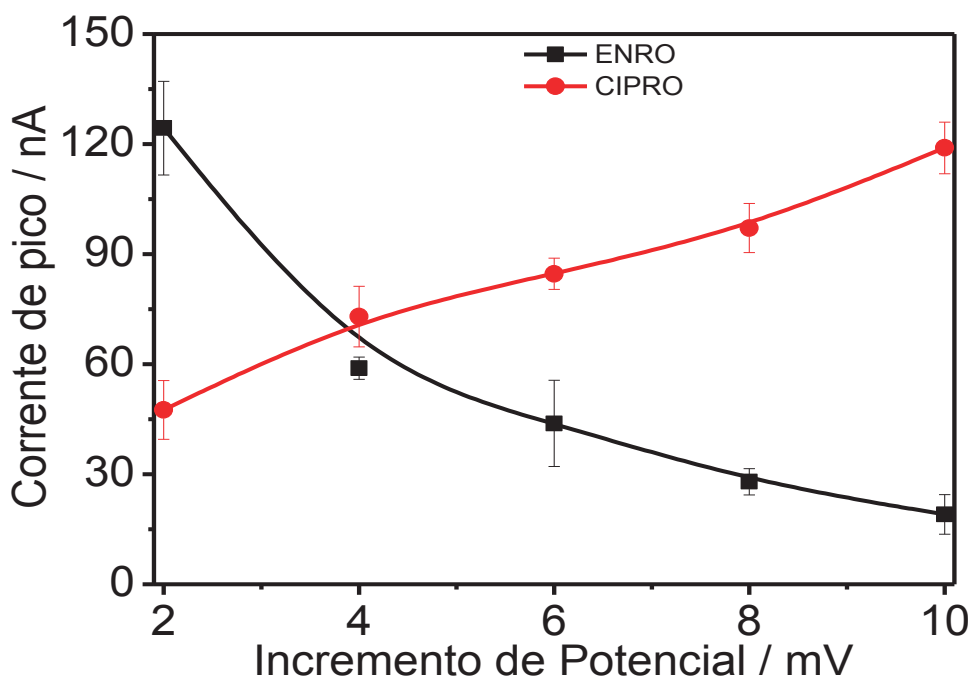
A frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), incremento de varredura de potencial (ΔE_s) e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}) são os parâmetros que podem influenciar mais significativamente na resposta voltamétrica. Dessa forma, visando obter a melhor resposta voltamétrica esses parâmetros foram

estudados nos seguintes intervalos: (f) de 10 a 20 Hz, incremento de potencial de 2 a 10 mV e amplitude de pulso de 10 a 45 mV.

O primeiro parâmetro investigado foi à frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) com o objetivo de se obter a melhor resposta voltamétrica. Notou-se que a variação da f ocasionou o aparecimento de ruídos quando investigou-se valores de f maiores ou menores de 10 Hz, portanto para este estudo o valor de frequência de 10 Hz foi escolhido como sendo ideal.

Em seguida, a influência do incremento de potencial (E_{sw}) foi avaliado sobre a intensidade da I_{pa} , para oxidação eletroquímica de CIPRO e ENRO $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ mantendo-se, $f = 10 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 13 - Influência da variação do incremento de potencial sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.

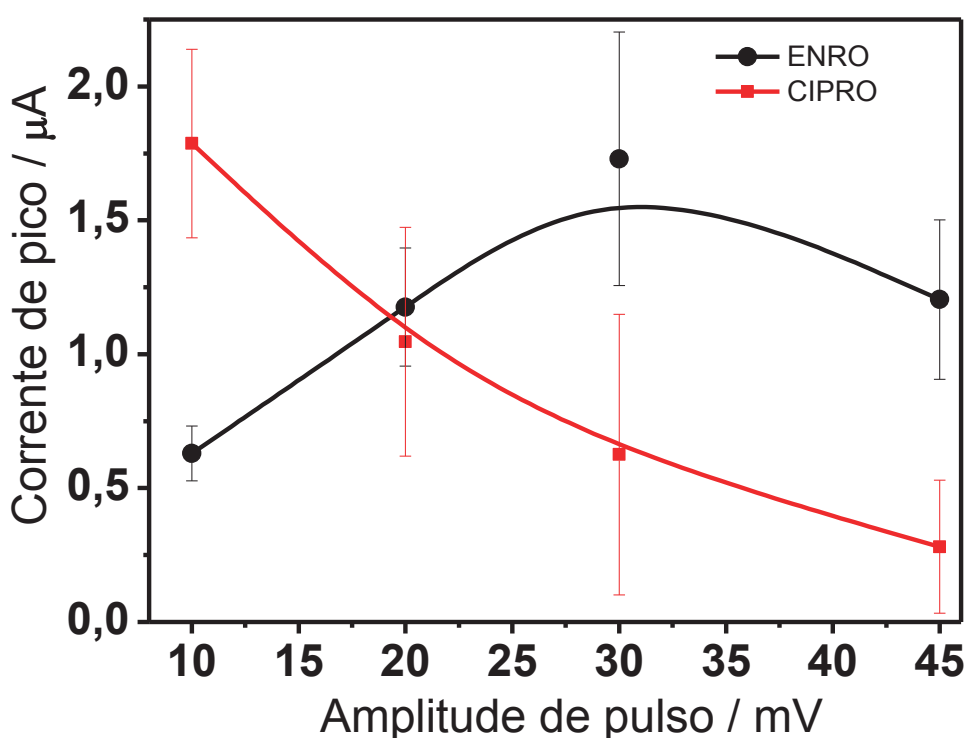


Adotou-se o valor o valor de E_{sw} ótimo em 4 mV, onde se obtém o menor desvio padrão entre as medidas uma vez que fora desse valor as medidas tende a apresentar maiores desvios e não mudando significativamente as correntes de pico. Fora da faixa estuda, acima de 10 mV e abaixo de 2 mV o sinal voltamétrico é bastante

comprometido pela perda de resolução dos voltamogramas o que pode ser notado observando voltamogramas acima dessa faixa. Assim sendo, um valor de E_{sw} de 4 mV foi escolhido para prosseguir com os estudos.

Finalmente, foi realizada a otimização da amplitude de potencial (ΔE_s) empregando-se $f = 10$ Hz e $E_{sw} = 4$ mV, previamente otimizados.

Figura 14 - Influência da variação da amplitude de pulso sobre os valores de I_{pa} para oxidação eletroquímica de $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CIPRO e ENRO sobre a superfície do ECV em meio de tampão BR 0,040 mol L⁻¹ pH 4,0.



Analisando o comportamento da I_{pa} na Figura 17 após variação do ΔE_s de 10 a 45mV, verifica-se uma significativa variação em todo intervalo estudado. Porém, em valores de ΔE_s acima de 6 mV, o perfil voltamétrico foi marcadamente influenciado pelo aumento da $W_{1/2}$ e, desta forma, o valor de ΔE_s 20mV foram adotados como sendo ideais para estudos visando propósitos analíticos.

Na Tabela 4 são mostradas todas as variáveis da VOQ que foram otimizadas, a faixa empregada na variação de cada uma das variáveis, assim como os seus valores otimizados.

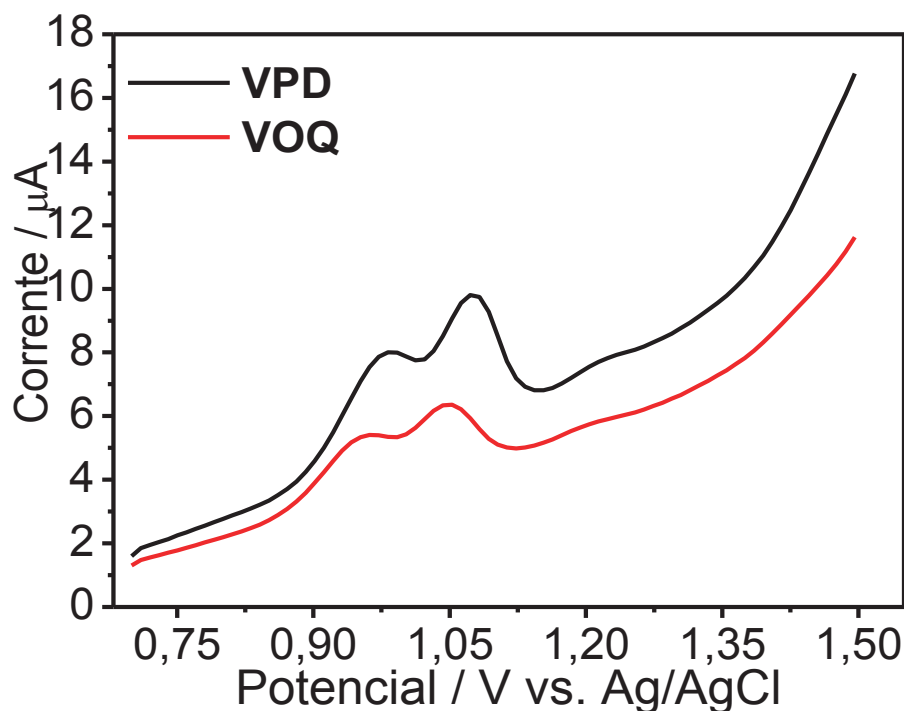
Tabela 4 - Parâmetros instrumentais otimizados para detecção simultânea de CIPRO e ENRO.

Técnica de pulso	Parâmetro	Intervalo testado	Valor otimizado
	Frequência (f) / Hz	10 – 20	10
	Intervalo de potencial (ΔE_s) / mV	2 – 10	4
	Amplitude de pulso (E_{sw}) / mV	10 – 45	20

5.3 Comparação dos resultados obtidos por Voltametria de pulso diferencial e Voltametria de Onda quadrada.

Nas seções anteriores foram apresentados os resultados das otimizações dos parâmetros instrumentais para demonstrar as respostas voltamétricas referentes a oxidação simultânea de CIPRO e ENRO, onde podemos observar os voltamogramas registrados com as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Quando comparados podemos observar que a VPD foi a que originou picos mais intensos e ligeiramente separados, tanto para CIPRO como para ENRO, conforme Figura 18. Portanto, a VPD permite a determinação simultânea de CIPRO e ENRO na mesma solução concomitantemente, sendo esta técnica escolhida para conduzir os demais experimentos.

Figura 15 - Voltamogramas de pulso diferencial (—) e onda quadrada (---), registrado sobre a superfície de ECV, para oxidação de CIPRO e ENRO ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: Tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Parâmetros: VPD: Incremento de potencial (ΔE_s) = 10 mV , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, Amplitude (E_{sw}) = 25 mV , tempo de pulso = 10 ms . VOQ: frequência (f) = 20 Hz , $E_{sw} = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



A otimização das técnicas ofereceu condições que possibilitam a detecção simultâneas, porém o pico ENRO (a $1,04 \text{ V}$) permaneceu sobreposto ao pico principal do CIPRO e a intensificação do sinal aumenta ainda mais a sobreposição de ambos. Assim o desafio de diferenciar com precisão os picos de FQs de uma mistura, durante a eletroanálise simultânea, ainda se manteve presente.

5.4 Estudo da variação de pH do eletrólito suporte

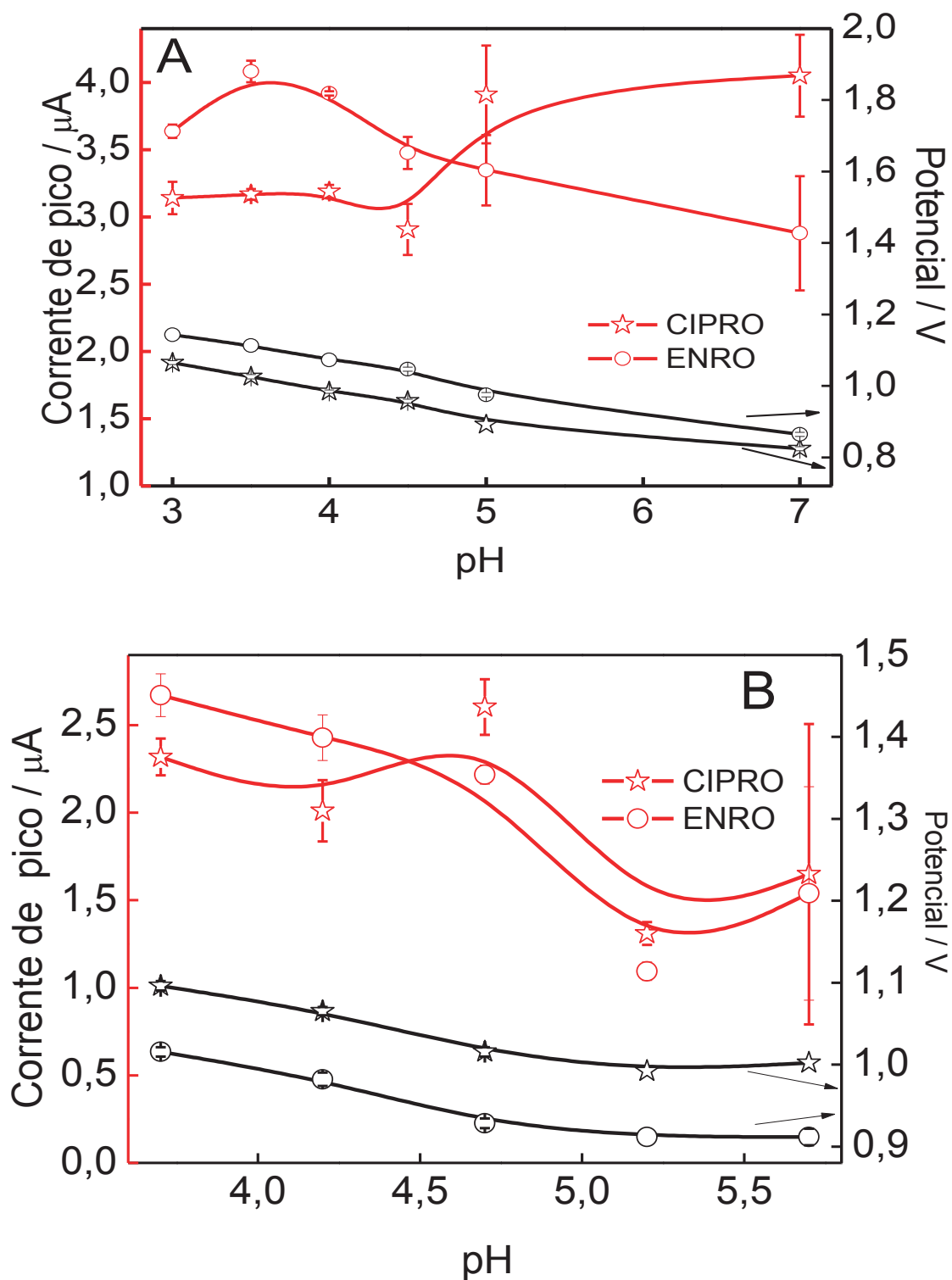
Como é de conhecimento, a variação do pH do eletrólito suporte exerce influência na obtenção de voltamogramas com maior resolução além de picos mais definidos com intensidade de corrente considerável e pode melhorar a discriminação dos sinais em uma análise simultânea.

Assim, foi investigada a variação da corrente de pico anódica (I_{pa}) com a variação do pH do eletrólito suporte. A natureza do eletrólito suporte foi investigada a partir do registro de voltamogramas de pulso diferencial para oxidação de CIPRO e ENRO $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções tampões de acetato ($0,040 \text{ mol L}^{-1}$) em uma faixa de pH de 3,5 a 6 e de Britton Robinson (BR) ($0,040 \text{ mol L}^{-1}$) em uma faixa de pH de 3 a 7.

Os resultados apresentados na Figura 19 indicam que a corrente de pico e o potencial de pico para ambas as fluoroquinolonas são fortemente afetados pelo pH.

Como pode ser visto na Figura 19, em ambos os eletrólitos estudados o E_{pa} desloca para valores menos positivos com o aumento do pH, indicando que o processo eletródico é influenciado por reações de protonação. Nota-se uma separação maior entre os potenciais de oxidação das FQs quando comparamos o tampão acetato com o tampão Britton Robinson o que torna esse mais interessante para ser utilizado com eletrólito suporte. Porém levando em consideração a maior corrente de pico para CIPRO e ENRO em solução tampão BR e a separação significativa entre os I_{pa} das FQs esse tampão foi selecionado como o eletrólito suporte.

Figura 16 - Efeito do pH do eletrólito no potencial de pico e corrente de pico de CIPRO e ENRO 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Solução tampão BR (Britton Robinson) (B) Solução tampão de acetato. Condições voltamétricas: $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, $E_{sw} = 75 \text{ mV}$, Tempo Intervalo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms. Eletrodo de referência Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{\text{saturado}}$.



5.5 Estudos da influência de surfactantes na resposta voltamétrica

A influência da adição do surfactante Laurilsulfato de sódio (LSS) como surfactante catiônico, foi avaliado utilizando voltamogramas de pulso diferencial em meio de tampão BR 0,040 mol L⁻¹ pH 5,0.

O efeito da adição do surfactante de LSS (Hoyer e Jensen, 2003, Hoyer e Jensen, 2006) em intervalo de concentração entre 0 e 2,5 µmol L⁻¹ foi avaliado por meio da oxidação simultânea de CIPRO e ENRO em 5,00×10⁻⁶ molL⁻¹ em tampão BR pH 4,0. Os resultados são apresentados na Figura 20. Observa-se que a concentração 1,0 µmol L⁻¹ de LSS fornece a máxima corrente de pico. Uma alta concentração de LSS diminuiu a resposta voltamétrica para ambas as fluoroquinolonas. Esse comportamento pode ser atribuído à formação de micelas que diminui o coeficiente de difusão das espécies eletroativas, levando a valores de pico de corrente mais baixos. Portanto, 1,0 µmol L⁻¹ LSS foi selecionado como condição ideal para a detecção simultânea de CIPRO e ENRO. Com base em trabalho anteriormente publicado objetivou-se a utilização do LSS como surfactante (Oliveira, de e Trindade, 2016).

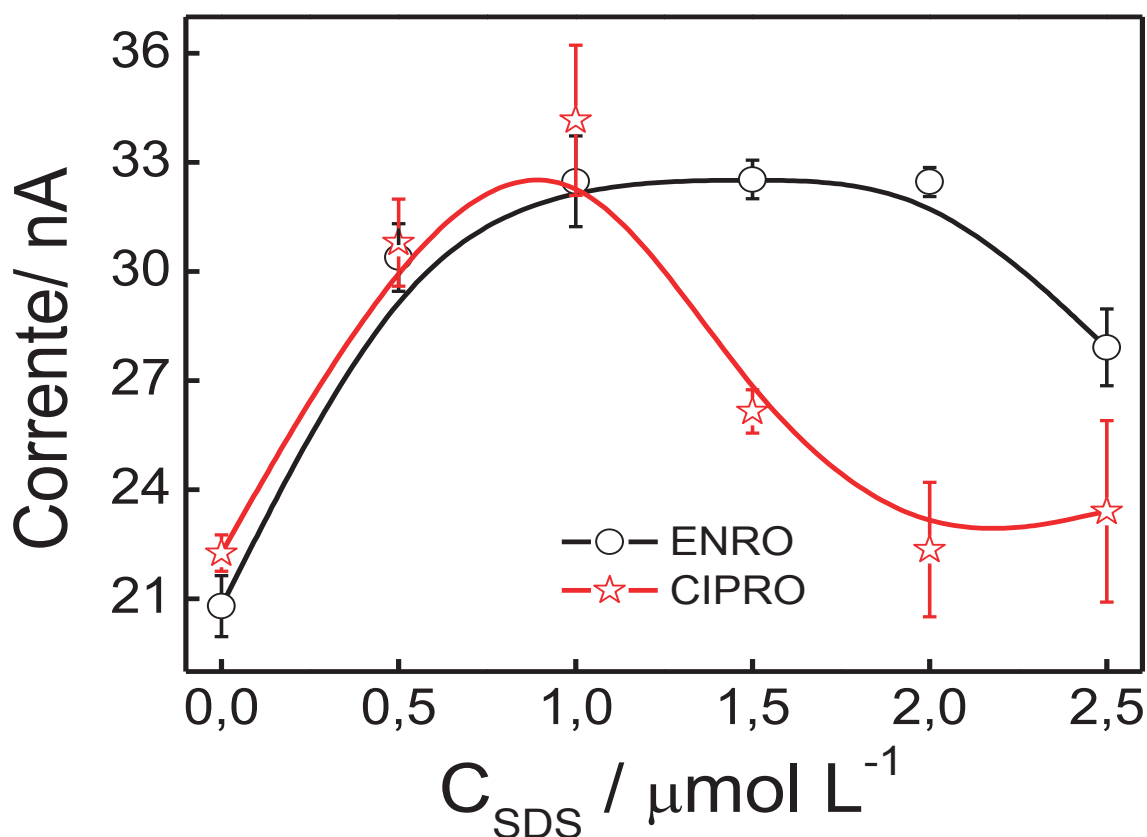


Figura 17 - Efeito da adição do surfactante LSS em diferentes concentrações na presença de tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 4,00, para a determinação simultânea de (A) CIPRO e (B) ENRO, ambos em $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $(\Delta E_S) = 10 \text{ mV}$, $\Delta E = 75 \text{ mV}$, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).

Em estudos eletroanalíticos envolvendo interações analito/surfactante é importante monitorar a concentração do surfactante no meio reacional, uma vez que, a partir de certa concentração a presença do surfactante pode não promover efeitos esperados conduzindo a resultados pouco satisfatórios, afetando diretamente o coeficiente de difusão da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.

A avaliação das interações que propiciam esses fenômenos deve levar em consideração que em concentrações de surfactante abaixo da concentração micelar crítica os mesmos encontram-se como monômero e as interações ocorridas entre o analito/surfactante pode ser predominantemente eletrostática. Todavia, devido ao fato de que uma grande quantidade de íons de carga oposta à do surfactante estarem na

solução eletrolítica, estes se tornam parte das micelas formadas. Assim, pode ocorrer uma redução no número de espécies disponíveis para o transporte de corrente elétrica, bem como na carga total dos agregados micelares para interação com o analito de interesse.

5.6 Procedimentos matemáticos

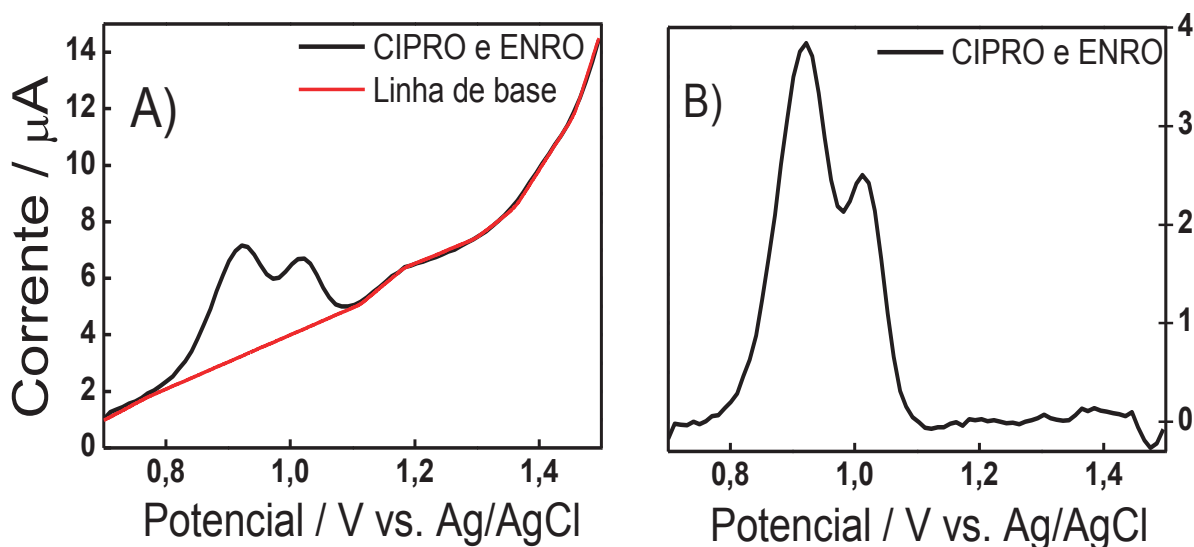
Mesmo após a otimização dos diversos parâmetros como eletrólito suporte, pH, surfactante e sua respectiva concentração, a técnica voltamétrica mais adequada e seus respectivos parâmetros, não foi possível se obter uma separação satisfatória entre os sinais das FQs conforme demonstrado na Figura 21A. Assim foi necessária a busca de soluções matemáticas que possibilitassem a detecção dessas FQs mesmo em situação de completa sobreposição de sinais. Técnicas como: deconvolução, primeira e segunda derivada foram utilizadas conforme foi descrito na parte experimental seção 4.5.

Assim objetivando a ampliação dos sinais de cada uma das FQs aplicou-se o método da segunda derivada com correção da linha base. Na Figura 21A é apresentado um voltamograma de pulso diferencial (VPD) original, sem o processo matemático de correção da linha base e após a correção da linha base do voltamograma original, conforme Figura 21B.

O processo de correção de linha base traz a possibilidade de se extrair do voltamograma ruídos de rede assim como alinhar os voltamogramas possibilitando uma quantificação com limites de detecção e quantificação maiores. Fica evidente na Figura 21B que a subtração da linha não só subtraiu os ruídos de rede como também tornou os sinais analíticos mais evidentes, sendo este procedimento essencial para a subsequente aplicação da primeira e segunda derivada.

Pode ser observado também que ao se comparar os sinais das Figuras A e B obtém-se uma melhor discriminação entre os sinais com maior precisão nos valores de potencias referente à oxidação das espécies CIPRO e ENRO.

Figura 18 - Voltamogramas PD: original (A) e o original com a linha base corrigido (B) para a eletro-oxidação de CIPRO e ENRO $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Sobre a superfície do eletrodo de ECV em tampão BR $0.040 \text{ mols L}^{-1}$, pH 4,0.

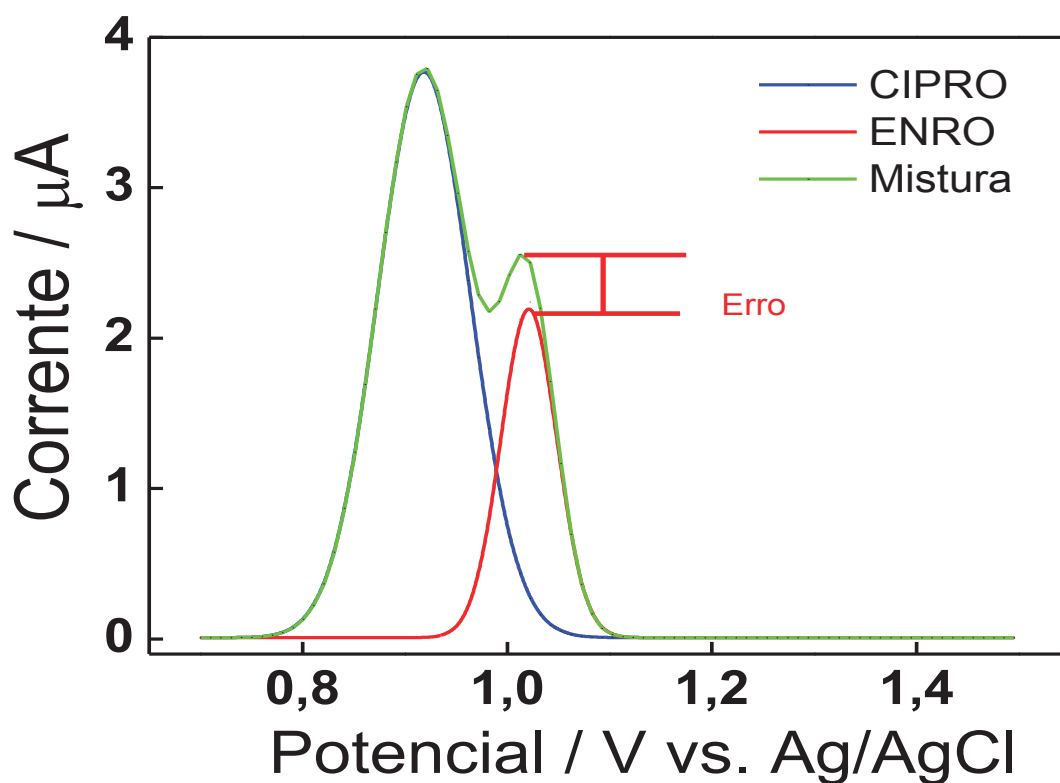


O processo de deconvolução também foi aplicado aos voltamogramas de VPD como ilustrado na Figura 22. Neste caso, pode ser observada a melhor discriminação com melhor precisão nos valores de potencias referente à oxidação de cada uma das espécies CIPRO e ENRO. A deconvolução apresenta um perfil muito interessante com picos bem definidos. Entretanto, a distância entre os potenciais de oxidação CIPRO e o potencial do segundo pico da ENRO, é de apenas 0,11 V, o que pode ocasionar problemas na obtenção dos valores de intensidade da corrente de pico.

Na Figura 22 é demonstrado, por meio da comparação do voltamograma original (—) com os deconvoluidos (—) (—), a queda na intensidade de sinal, sendo que o sinal referente ao pico de oxidação da CIPRO (—) sofre uma diminuição de intensidade na ordem de 12,7 %. Dessa forma entende-se que, o processo matemático de deconvolução influencia na precisão do resultado com um erro

considerável (barra de erro —) e nestas condições, tal método, não é uma alternativa viável.

Figura 19 - Voltamogramas de pulso diferencial, com a linha base corrigida (—), submetido ao processo matemático de deconvolução, onde são apresentados os sinais referentes a eletro-oxidação de ENRO (—), CIPRO (—), de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Sobre a superfície do eletrodo de ECV em tampão BR $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, com $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS. Condições: $(\Delta E_S) = 10 \text{ mV}$, $\Delta E = 75 \text{ mV}$, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms , Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).

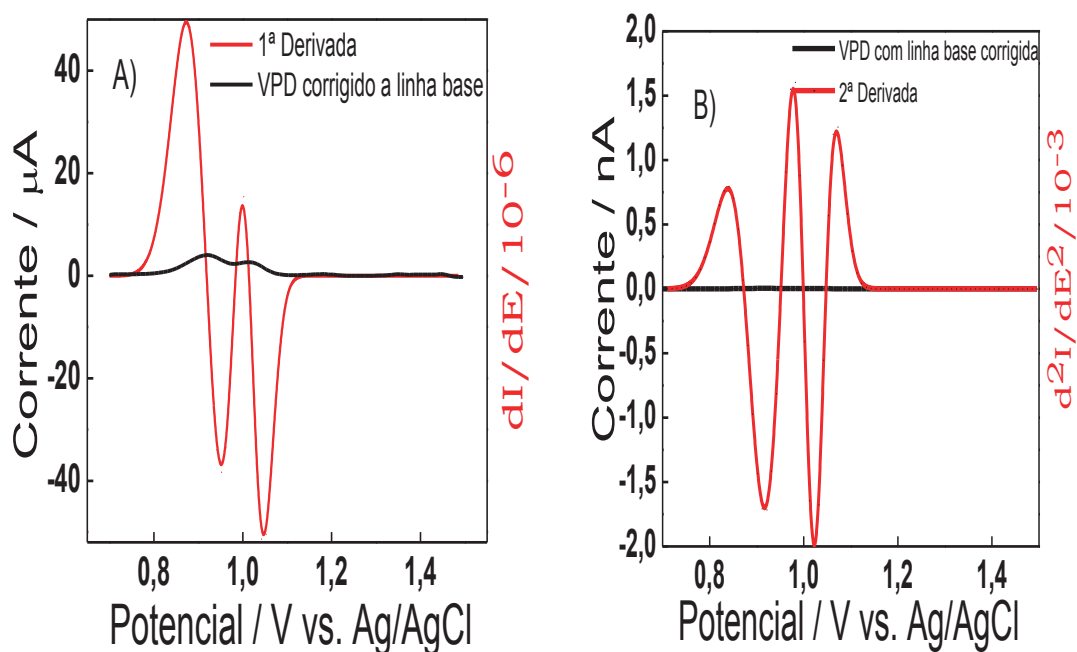


Assim a primeira e a segunda derivada podem ser alternativas eficientes para a separação de sinais parcialmente sobrepostos, e seu uso tem sido difundido em diversos métodos de análise, entre os quais: espectrofotométricos, potenciométricos e voltamétricos (Oliveira e Trindade, 2016, Elsabee e Prankerd, 1992, Norli, Christiansen e Holen, 2010b, Marbán, Vu e Valdés-Solís, 2011). Um destes exemplos, é o método desenvolvido por Cobelo-García *et al.*, 2014, aplicado em amostras com altos níveis de espécies concomitantes com potencial interferente, como água e sedimentos, na determinação voltamétrica de platina.

Assim considerando essas possibilidades na Figura 23, é mostrado os voltamogramas (VPD) após a aplicação da primeira derivada (Figura 23A, voltamograma —) e a segunda derivada (Figura 23B, voltamograma —), ambos comparados com os obtidos somente com a correção da linha base (Figura 23, voltamograma—, **A** e **B**). Nitidamente, o sinal do voltamograma com apenas a correção da linha base promoveu melhoria significativa do sinal eletroanalítico, assim como a separação entre os sinais, porém ainda assim não se mostrou suficiente para a quantificação.

A aplicação da derivada nos sinais obtidos a partir do tratamento da linha de base nota-se que houve amplificação dos picos das duas espécies. Acompanhando esse raciocínio, observa-se que houve um aumento para a primeira derivada da ordem de 9,04 (ENRO) e 18,5 (CIPRO), vezes, e para a segunda derivada este aumento, foi ainda maior, da ordem de 413,7 (ENRO), 703,7 (CIPRO).

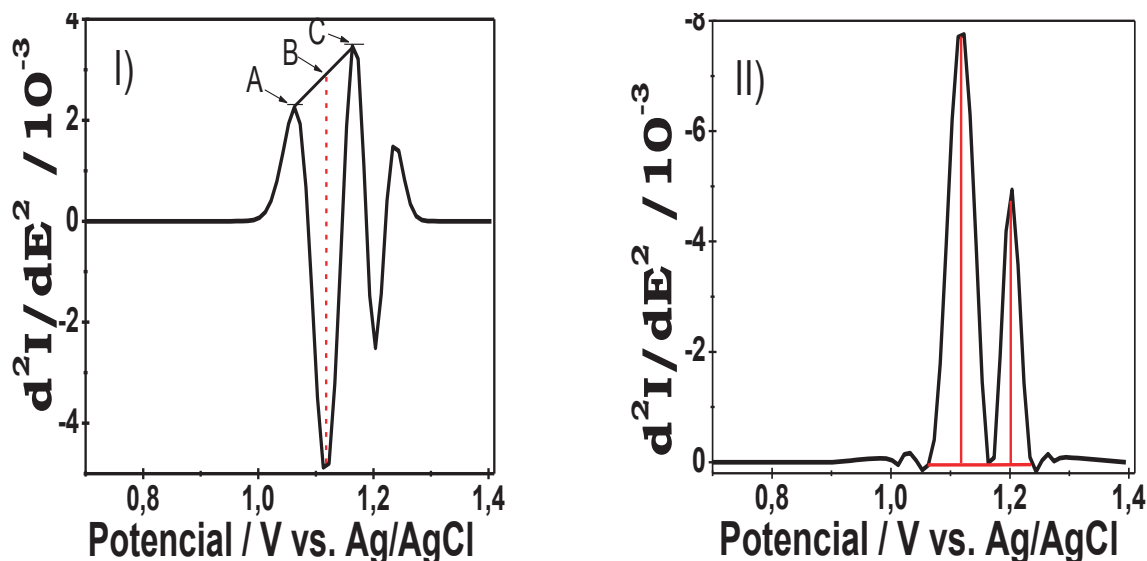
Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial, com a aplicação: (A) de apenas a correção da linha base (—), correção da linha base juntamente com primeira derivada (—), (B) apenas a correção da linha base (—) e correção da linha base juntamente segunda derivada (—). Condições: 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ das FQs CIPRO e ENRO, sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 4,0 com 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LSS. Condições: (ΔE_S) = 10 mV, ΔE = 75 mV, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).



Antes de todos os métodos de medida de corrente foi necessário a correção da linha base conforme é demonstrado na Figura 24 (A e B). Neste caso, a Figura 24A apresenta o VPD com a aplicação da segunda derivada antes da correção da linha base.

A escolha do modo de medida da corrente de pico também é fundamental para obtenção precisa e exata da intensidade de corrente de pico. Segundo (Almécija, Cobelo-García e Santos-Echeandía, 2016), esta medida pode ser realizada de três modos: (a) no início do pico, (b) do início ao final do pico, e (c) no final do pico, como indicado na Figura 24A.

Figura 21 - (I) Voltamograma de segunda derivada mostrando o ajuste da linha de base convencional: (A) linha de base horizontal do pico frontal, (B) linha de base do pico-pico e (C) linha de base horizontal do pico traseiro. (II) voltamograma de pulso diferencial após o método derivativo de segunda ordem com linha base corrigida. Condições: (ΔES) = 10 mV, ΔE = 75 mV, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).



No presente trabalho optou-se pela medida na qual inicia-se ao fim do pico (c), cujo processo tem sido comum nas medidas voltamétricas com correção de linha base. Entretanto, cabe ressaltar que, em todos os métodos de medida foi necessário a correção da linha base antes e após o processo. Portanto, na Figura 24B está apresentado o VPD com correção da linha base antes e após a aplicação da segunda derivada. Dessa forma o procedimento matemático de segunda derivada com a linha base corrigida (Figura 24) levou a uma distinção satisfatória do primeiro pico da ENRO em relação ao segundo pico da CIPRO tornando possível a detecção de ambas as substâncias simultaneamente.

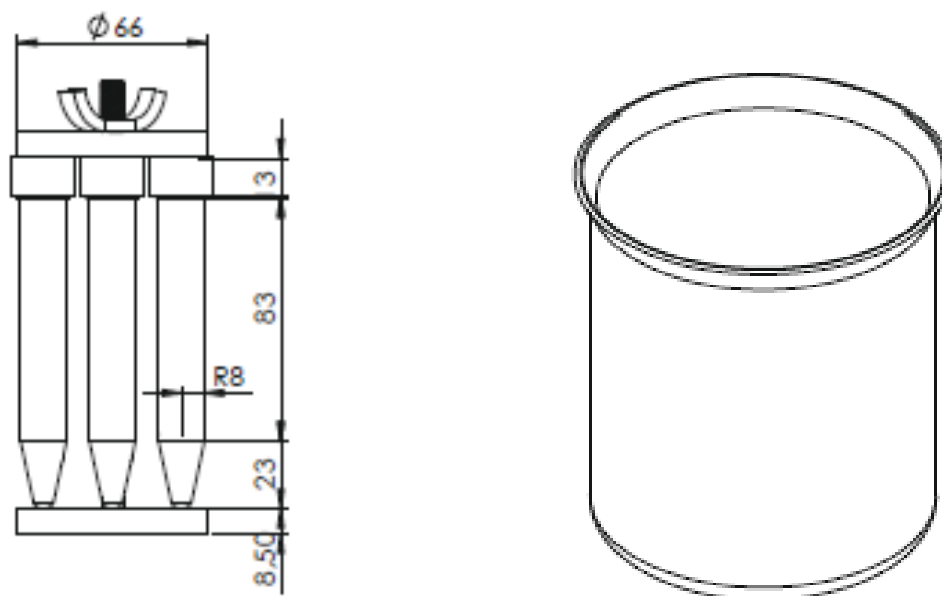
Nota-se ainda que a aplicação dos procedimentos matemáticos ocasiona um aumento da resolução dos sinais voltamétricos, assim como proporciona um aumento na intensidade do sinal durante as análises, possibilitando análises em que a concentração dos analitos encontram-se a níveis traço e o sinal é praticamente imensurável. Dessa forma esses tratamentos matemáticos proporcionam uma

diminuição nos limites de detecção e quantificação possibilitando análises nas quais os analitos se encontram em níveis de traço.

5.7 Equipamento para extração

A extração é realizada com temperatura de 60 a 70 °C em um meio de acetona/água, variando em torno de (20 e 30%), levando a um considerável aumento da pressão interna do dispositivo de extração ocasionando uma série de problemas durante as fases iniciais do trabalho. Observou-se que com o aumento da temperatura ocorria o rompimento do sistema de fechamento do tubo falcon impossibilitando a extração das FQs nessa temperatura de trabalho. Dessa forma foi idealizado um dispositivo de travamento das aberturas dos tubos falcon para ser utilizado no momento da extração. Na Figura 25 está mostrado o dispositivo de travamento utilizado.

Figura 22 - Equipamento de travamento e acomodação dos tubos falcon para a extração com temperatura controlada.



O desenho ilustrado na Figura 25 mostra um sistema simples, porém imprescindível para a extração proposta levando em consideração a otimização do

tempo de agitação (10 - 20 min), o volume de solvente (12,5 - 25% v / v), massa de KCl (20-30%) e temperatura (60 - 70 °C).

5.8 Condições de trabalho e obtenção da curva analítica

Na Tabela 5, estão reunidos os parâmetros instrumentais e experimentais e a aplicação de recursos matemáticos avaliados e otimizados deste trabalho.

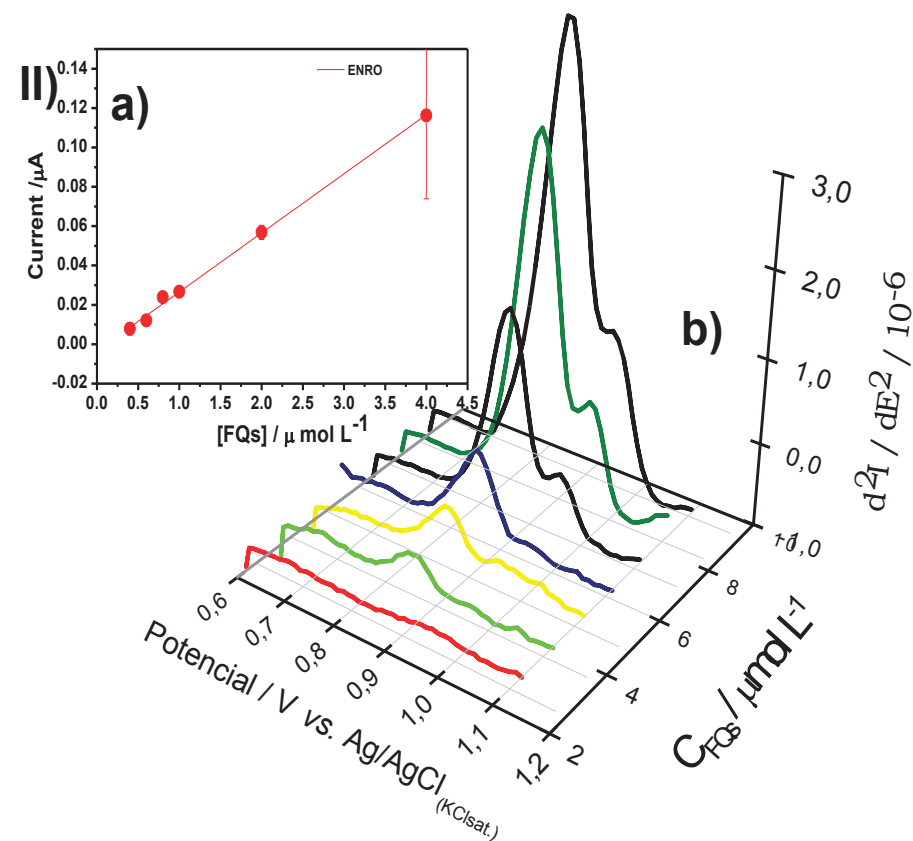
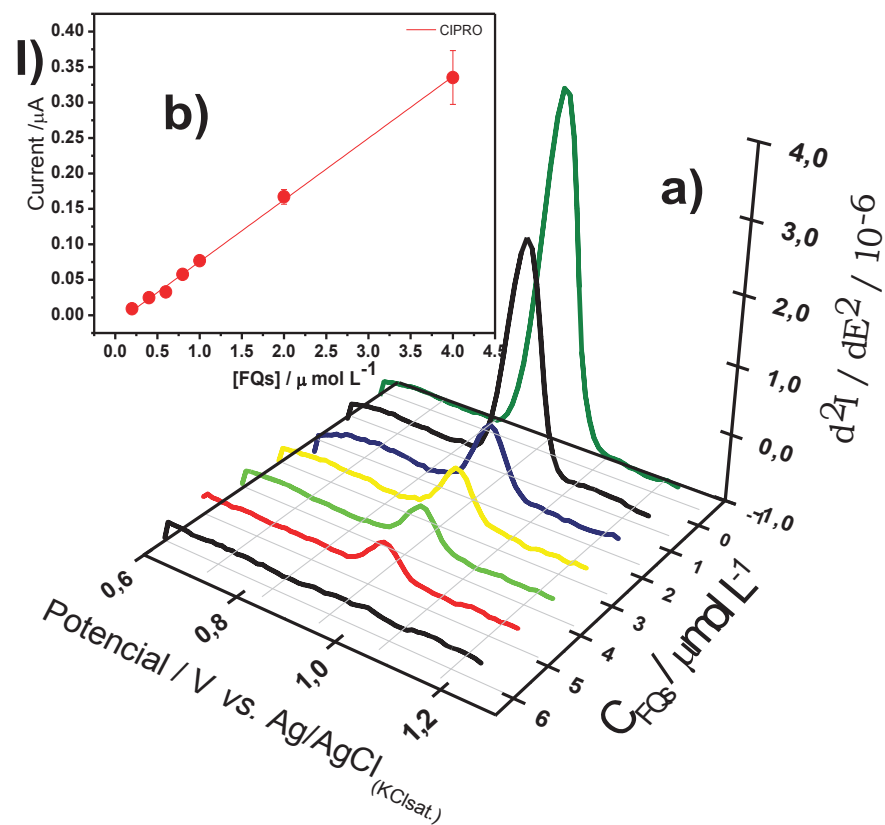
Tabela 5 - Parâmetros experimentais e instrumentais estudados e otimizados para detecção simultânea das FQs.

	Tipo testado	Otimizados
Técnicas Voltamétricas	VPD, VOQ	VPD
Condições experimentais		
Parâmetros	Intervalo ou tipo testado	Otimizados
Eletrólito de suporte	Tampão acetato e BR	BR
conc. estudada / mol L ⁻¹	0,040	0,040
pH do tampão	3,0 – 7,0	4,0
Surfactantes	LSS	LSS
Concentração de LSS / μmol L ⁻¹	0 – 2,5	1,0
Método de separação de sinais		
Métodos matemáticos	Testado	Otimizado
Algoritmos, Maior é melhor (MM)	deconvolução, 1° e derivada	2° derivada e MM

Após a otimização das condições de trabalho conforme apresentado na Tabela 5, realizou-se estudos monitorando a oxidação eletroquímica de CIPRO e ENRO em diferentes concentrações. A partir dos valores de corrente de pico em 0,93 e 1,05V, para ENRO e CIPRO respectivamente empregando-se o método matemático de

segunda derivada com correção de linha base foi construída uma curva de calibração individual, em que cada ponto representa à média de três medidas experimentais

Figura 26 - (A) Voltamogramas PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação individual de CIPRO e ENRO (I e II respectivamente), na faixa de concentrações de 0,25 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre a superfície do EI-CV. (B) Inserção: Curva de calibração, dependência da corrente de pico em função da concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 7.



Com os dados extraídos da curva (compilados na Tabela 6), foi calculado limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), usando equação 5 e 6, respectivamente. Nas equações, **SD** representa o desvio padrão do intercepto e **b** a inclinação da curva de calibração. Os valores de LD e LQ bem como os dados referentes a curva de calibração estão reunidos na Tabela 6.

$$\text{Limite de detecção} = 3 \times \frac{SD}{b} \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Limite de quantificação} = 10 \times \frac{SD}{b} \quad \text{Equação 6}$$

A Tabela 6 apresenta todos os parâmetros das curvas de calibração conforme Figura 26, para a análise individual de CIPRO e ENRO.

Tabela 6 - Parâmetros de confiabilidade analítica obtidos para a curva de calibração individual de CIPRO e ENRO.

Parâmetros	Análise individual	
	CIPRO	ENRO
Intervalo Linear de trabalho / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,25 – 4,00	0,25 – 4,00
Inclinação / $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1}$	0,087	0,030
Intercepto / μA	-0,0113	-0,0034
Coeficiente de correlação (r)	0,999	0,998
Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,082	0,133
Limite de quantificação / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,273	0,443

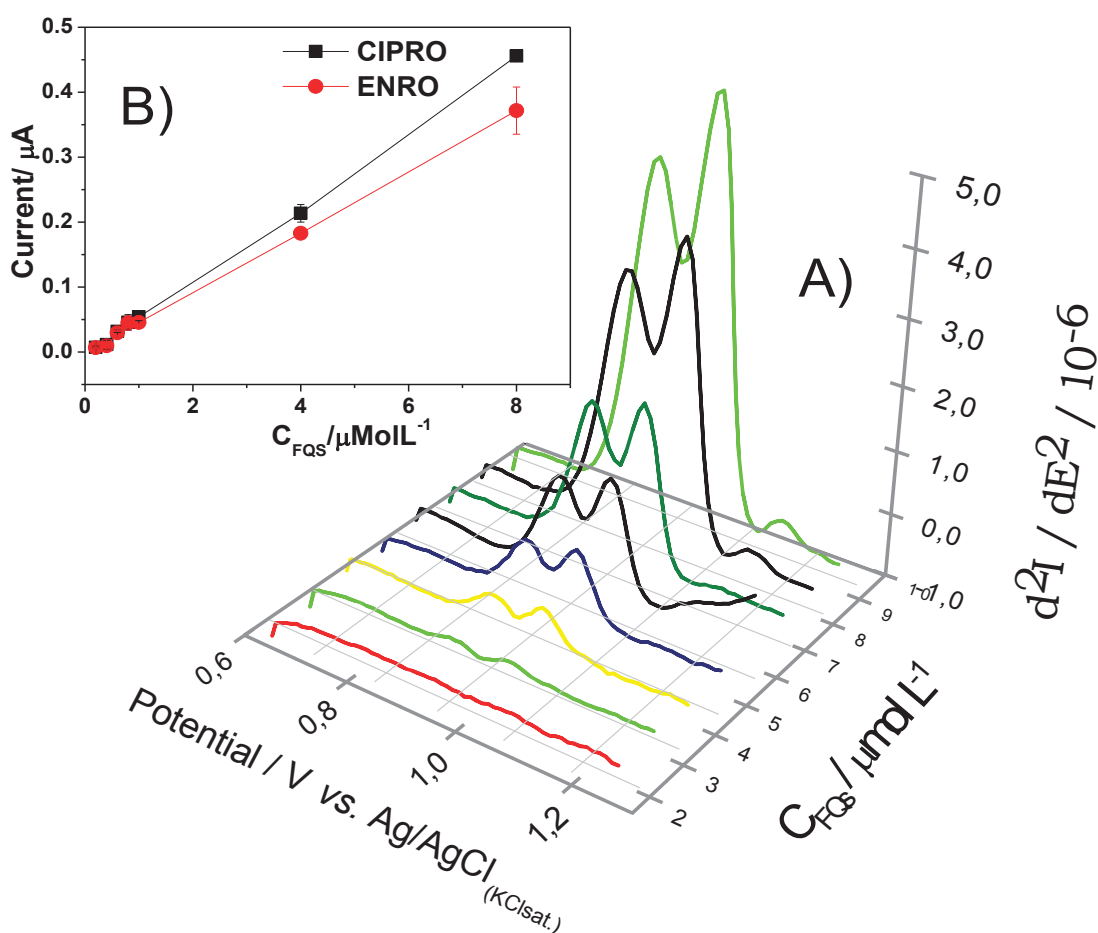
De acordo com os valores de LD calculados para cada espécie individualmente, CIPRO ($\text{LD}_{\text{CIPRO}} = 0,082 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENRO ($\text{LD}_{\text{ENRO}} = 0,133 \mu\text{mol L}^{-1}$), onde verifica-se que atendem aos requisitos para a quantificação em níveis traço.

Sendo a proposta do trabalho a quantificação simultânea de CIPRO e ENRO, obteve-se as curvas de calibração em uma análise simultânea para as FQs CIPRO e

ENRO a quais estão representadas na Figura 23, juntamente com os seus respectivos voltamogramas.

Importante salientar que para a obtenção da curva de calibração simultânea foi empregado o método matemático descrito nas equações 5 e 6 de forma a tornar satisfatória a distinção entre os sinais das FQs.

Figura 237 - (A) Voltamogramas PD após a aplicação da segunda derivada, com correção de linha de base, indicando eletro-oxidação simultânea de CIPRO e ENRO, na faixa de concentrações de 0,25 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre a superfície do EI-CV. Inserção: (B) Curva de calibração, dependência da corrente de pico em função da concentração das FQs. Utilizando as condições experimentais e instrumentais otimizadas da Tabela 6.



De acordo com os valores de LD calculados para a detecção simultânea de CIPRO ($LD_{CIPRO} = 0,143 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENRO ($LD_{ENRO} = 0,170 \mu\text{mol L}^{-1}$), conforme Tabela 6, verifica-se que atendem os requisitos para a quantificação em níveis traço.

Tabela 7 - Parâmetros obtidos para a curva de calibração de CIPRO e ENRO, tal como na Figura 27.

Parâmetros	Análise Simultânea	
	CIPRO	ENRO
Intervalo Linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,25 – 8,00	0,25 – 8,00
Inclinação / $\mu\text{AL } \mu\text{mol}^{-1}$	0,057	0,0406
Intercepto / μA	$-6,0 \times 10^{-4}$	-0,0001
Coeficiente de correlação (r)	0,999	0,999
Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,143	0,170
Limite de Quantificação / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,470	0,566

Assim, considerando a faixa de trabalho empregada $0,250 - 4,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ para detecção individual e de $0,25 - 8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ para detecção simultânea, com coeficiente de correlação sempre próximo de 0,998 (Tabela 7) e que o limite de detecção variou entre 0,082 (CIPRO) e 0,170 (ENRO) $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dessa forma os parâmetros das curvas analíticas revelam que tanto a detecção individual como a simultânea podem ser utilizadas.

5.9 Preparo da amostra via microextração líquido-líquido

Para minimizar o número de medidas e tornar o processo de extração mais rápido, mais barato e confiável, utilizou-se um planejamento fatorial completo de 2^5 como descrito na seção experimental 4.9, dessa forma obteve-se o número de 32 experimentos assim como os valores das variáveis a serem estudadas. A Tabela 8 mostra os níveis alto e baixo a serem explorados em cada uma das variáveis para avaliar o procedimento MELL-AT-CS-AM, no qual seu desempenho (média de duas repetições) foi avaliado por meio da corrente de pico intensidade I_p . Os resultados aplicados no gráfico de Pareto Figura 28, com o nível de confiança de 95%, mostraram

uma interação entre a temperatura e o sal com o valor de 2,38 para ENRO e 3,29 para CIPRO.

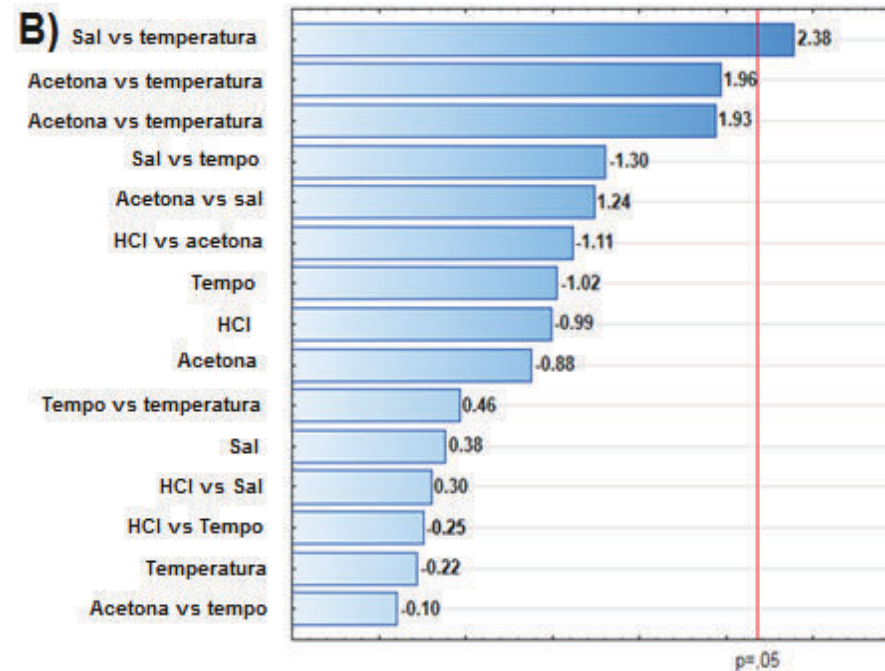
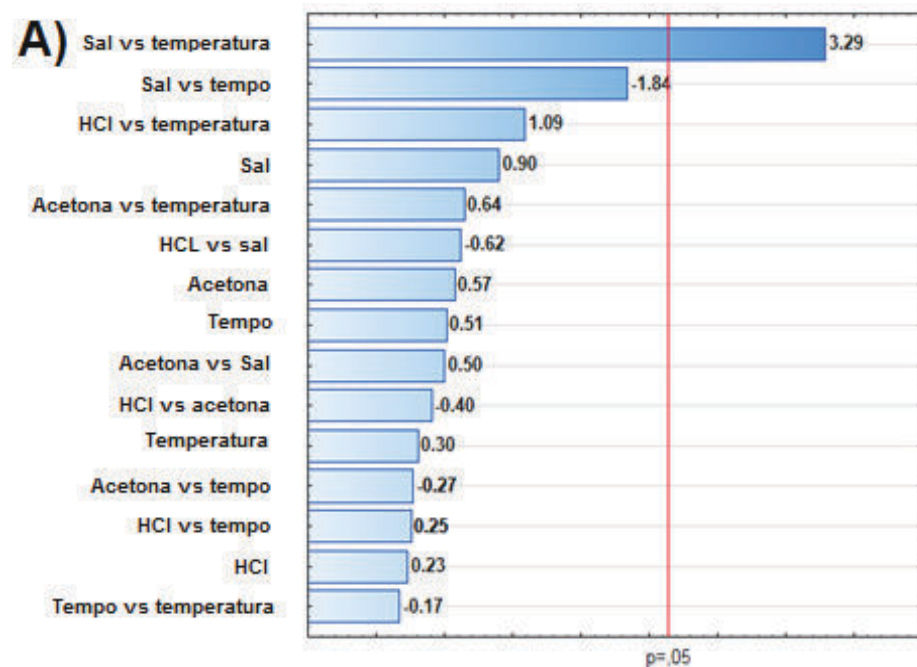
Tabela 8 - Resumo dos parâmetros quimiométricos (com um planejamento fatorial completo 2^5) usado para avaliar o procedimento MELL-AT-CS-AM e seu desempenho por meio da intensidade de pico da corrente.

Fatores						Níveis	
						Baixo(-1)	Alto (1)
HCl / mol L ⁻¹						0,7	1,0
Acetona / %						30,0	37,5
KCl / %						20	30
Tempo / min						10	20
Temperatura / °C						60	70
Ensaio	Parametros e variação					Desejabilidade (di) ^[a]	
	HCl	Acetona	Sal	Tempo	Temperatura	I _p CIPRO	I _p ENRO
1	-1	-1	-1	-1	-1	0,71	1,00
2	1	-1	-1	-1	-1	0,53	0,77
3	-1	1	-1	-1	-1	0,49	0,72
4	1	1	-1	-1	-1	0,43	0,57
5	-1	-1	1	-1	-1	0,40	0,64
6	1	-1	1	-1	-1	0,38	0,74
7	-1	1	1	-1	-1	0,49	0,69
8	1	1	1	-1	-1	0,46	0,53
9	-1	-1	-1	1	-1	0,68	0,95
10	1	-1	-1	1	-1	0,47	0,64
11	-1	1	-1	1	-1	0,56	NM
12	1	1	-1	1	-1	0,93	NM
13	-1	-1	1	1	-1	0,42	0,60
14	1	-1	1	1	-1	0,53	0,69
15	-1	1	1	1	-1	0,59	0,66
16	1	1	1	1	-1	0,12	0,20
17	-1	-1	-1	-1	1	NM	NM
18	1	-1	-1	-1	1	NM	NM
19	-1	1	-1	-1	1	0,14	0,31

Ensaio	Parametros e variação					Desejabilidade (di) ^[a]	
	HCl	Acetona	Sal	Tempo	Temperatura	I_{pCIPRO}	I_{pENRO}
20	1	1	-1	-1	1	0,40	0,52
21	-1	-1	1	-1	1	0,50	0,63
22	1	-1	1	-1	1	0,74	0,85
23	-1	1	1	-1	1	1,12	1,20
24	1	1	1	-1	1	0,74	0,85
25	-1	-1	-1	1	1	0,47	0,62
26	1	-1	-1	1	1	0,51	0,63
27	-1	1	-1	1	1	0,45	0,57
28	1	1	-1	1	1	0,54	0,69
29	-1	-1	1	1	1	0,46	0,46
30	1	-1	1	1	1	0,70	0,70
31	-1	1	1	1	1	0,57	0,72
32	1	1	1	1	1	0,66	0,68

[a] - cálculos de valor conforme descrito na seção 4.8 [NM] valor não medido -

Figura 28 - Gráfico de Pareto obtido a partir de um projeto fatorial completo de 2^5 para avaliar o desempenho da extração de ENRO (A) e CIPRO (B). Valor na Tabela 8.



De acordo com a Figura 28 (A e B) as interações entre as demais variáveis não foram significativas e suas interação apresentaram valores negativos mais negativos. Desta forma, foi adotado os níveis mais baixos para acetona, HCl e tempo. A análise de variância (ANOVA) mostrou coeficientes de regressão aceitáveis e observou-se que esses modelos são adequados para serem aplicados nos dados porque a falta de ajuste não é significativa (para 95% do nível de confiança). Estes resultados podem ser observados na tabela de teste F (Tabela 9), onde a razão MS (média quadrática) falta de ajuste / MS (média de quadrado) erro puro para o quadrático foram 7,99 (CIPRO) e 2,35 (ENRO), não excedendo o valor tabulado 18.51 no nível de confiança de 95%.

Tabela 9 - Análise de Variância para o modelo quadrático.

FQs			CIPRO	ENRO
	GL	F _{tabelado}	F _{calculado}	F _{calculado}
MQ _{FAj} / MQ _{ep}	F _{1,2}	18.51	7.99	2.35

MQ = Média quadrática; _{FAj} = falta de ajuste; _{ep} = erro puro;

As variáveis mais significativas (sal e temperatura) foram otimizadas usando a matriz Doehlert com ponto central, tal como apresentado na Tabela 10.

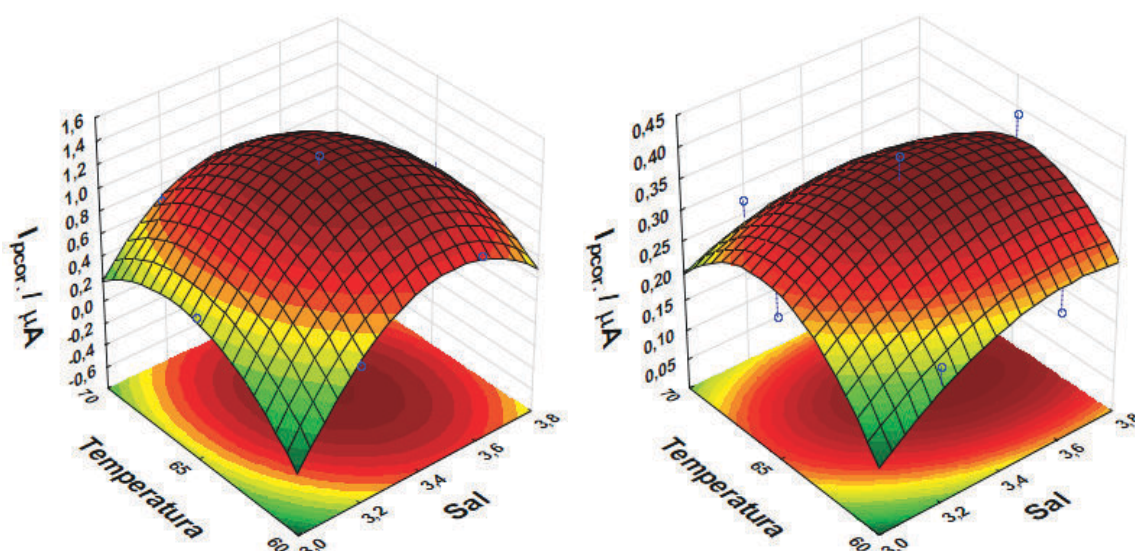
Tabela 10 - Dados e parâmetros da matriz Doehlert utilizada na otimização do método MELL-AT-CS-AM.

Ensaio	Parâmetros e Variação (min.)		Desejabilidade (di) ^[a]	
	Temperatura / °C	Sal / g	ENRO	CIPRO
1	1 (70)	0 (25)	0,75	0,38
2	0.5 (67,5)	0.866 (30)	0,72	0,19
3	-1 (60)	0 (25)	0,46	0,23
4	-0.5 (62,5)	-0.866 (20)	0,40	0,22
5	0.5 (67,5)	-0.866 (20)	0,84	0,21
6	-0.5 (62,5)	0.866 (30)	0,66	0,27
7	0 (65)	0 (25)	1,28	0,34
8	0 (65)	0 (25)	1,26	0,40
9	0 (65)	0 (25)	1,36	0,35

^[a]Os dados de desejabilidade foram obtidos conforme seção experimental 4.9.

Figura 29 - Superfície de resposta para ENRO (A) CIPRO (B) obtida para fatores de sal e temperatura.

* Corrente de desejabilidade obtida como Tabela 10.



A Figura 29 mostra as superfícies de resposta aplicadas aos efeitos variáveis principais acima mencionados (KCl e temperatura) e a Tabela 11 resume a melhor

condição otimizada para executar o procedimento MELL-AT-CS-AM proposto e maximiza sua eficiência de extração. Ressalta-se que, na análise da amostra alimentar de origem animal, embora a acetona (polaridade média) possa extrair compostos de polaridade média juntamente com analitos, este solvente não extraiu quantidade significativa de gorduras, como foi observado em geral solventes apolares (por exemplo, hexano, ciclo-hexano e octanol).

Tabela 11 - Informações sobre os parâmetros otimizados no procedimento MELL-AT-CS-AM mostrado na seção experimental 4.8.2.

Parâmetros	Tipo e/ou intervalo testado	Otimizado
Extração prévia		
Concentração de HCl / mol L ⁻¹	0.7 -1,0	0.7
Solução para ajuste de pH	HCl, NaOH	todos
Re-extração		
Sal	KCl,	KCl
Quantidade de acetona / %	30 e 37,5	33,75
Sal/%	20 - 30	25
Solução para ajuste de pH	HCl, NaOH	Todos
Tempo de extração / min	10 – 20	20
Temperatura / °C	60 – 70	65
Extrator	Tampão acetato, BR e HCl	HCl
pH	1,0 – 10.0	7,0

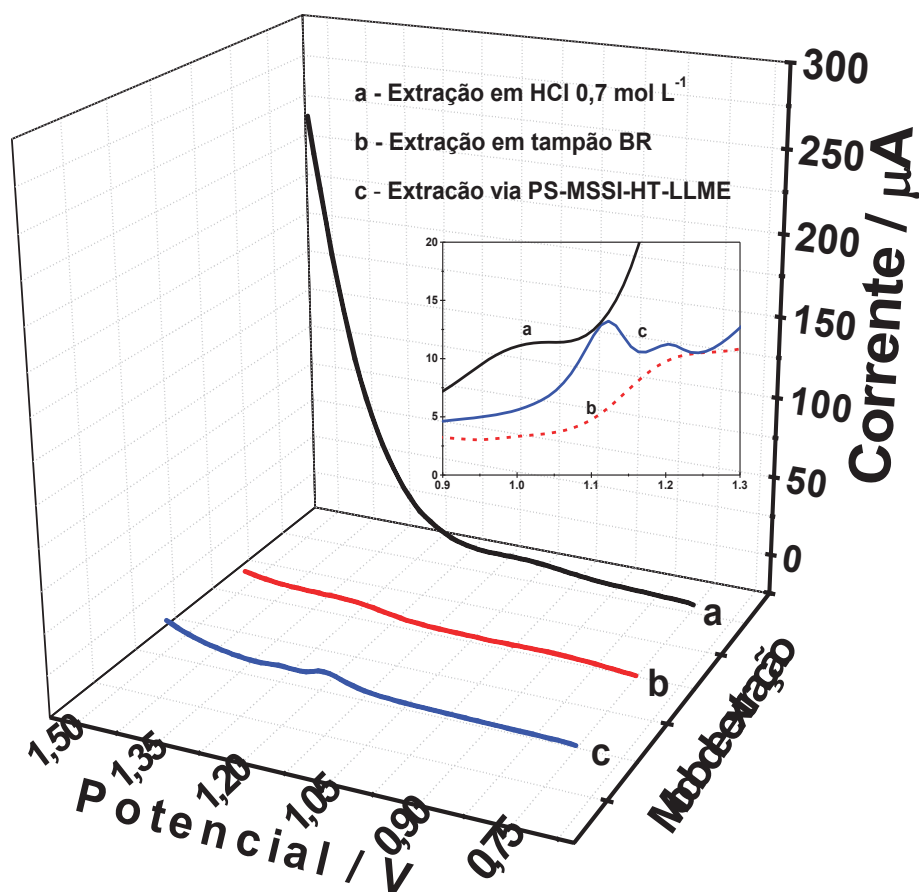
5.10 Desempenho eletroanalítico com e sem MELL-AT-CS-AM

As amostras de alimentos selecionadas para o trabalho apresentam um alto nível de complexidade. Neste sentido é imprescindível uma etapa de preparo de amostra eficiente que permita extrair o analito e remover possíveis interferentes tais como lipídios, proteínas, carboidratos etc (Golet, Alder e Giger, 2002b). Nesse contexto, o preparo de amostra em técnicas eletroquímicas pode ser extremamente tedioso e complexo, de forma que a eletroanálise direta das FQs seria uma alternativa atrativa para superar esse problema. Assim, com o objetivo de reduzir o conjunto de etapas experimentais, testamos a extração de FQ usando apenas o HCl $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, (Figura 30, a) e tampão Britton-Robinson (BR) $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4.0, (Figura 30, b), ou seja uma extração direta, conforme descrito na seção 2.4.1. Os perfis voltamétricos mostraram apenas uma onda ampla - a $1,00 \text{ V}$ (Figura 30, a) e $1,21 \text{ V}$ (Figura 30, b) - com uma má definição de ambos os picos de FQs. Isso é indicativo de um forte efeito de matriz ocasionados pela presença de vários constituintes biológicos que aderem à superfície do eletrodo e, conseqüentemente, inibem os sinais do FQs.

O uso do procedimento MELL-AT-CS-AM proposto antes da eletroanálise podemos observar uma leve melhora no perfil voltamétrico, permitindo a separação dos picos das FQs (Figura 30, c). Neste, o método MELL-AT-CS-AM proposto permite submeter os analitos extraídos a uma alta diluição em fase aquosa para dispersar os concomitantes da matriz no meio e assim reduzir os interferentes e seus efeitos sobre a superfície do eletrodo. Além disso, o procedimento MELL-AT-CS-AM forneceu a dispersão do solvente extrator de baixa densidade (acetona) no meio da amostra, permitindo a re-extração das FQs. No entanto, como as amostras de carne apresentam interferentes que podem dificultar a detecção, foi realizado a verificação

da metodologia afim de a sua eficácia. Além disso, levando em consideração que esse processo envolve muitas variáveis e várias etapas experimentais, utilizamos várias estratégias para otimizar o procedimento MELL-AT-CS-AM e superar o problema dos interferentes.

Figura 2430 - Voltammogramas pulso diferencial registrados para eletrooxidação de CIPRO e ENRO a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, para diferentes procedimentos de extração: (a) HCl $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, (b) Buffer BR e (c) MELL-AT-CS-AM como eletrólito de suporte, tampão BR (a $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0). Condições: (ΔE_s) = 10 mV, ΔE = 75 mV, intervalo de tempo = 50 ms e tempo de modulação = 60 ms, na amostra de frango. Eletrodo de referência Ag / AgCl (KCl sat.).

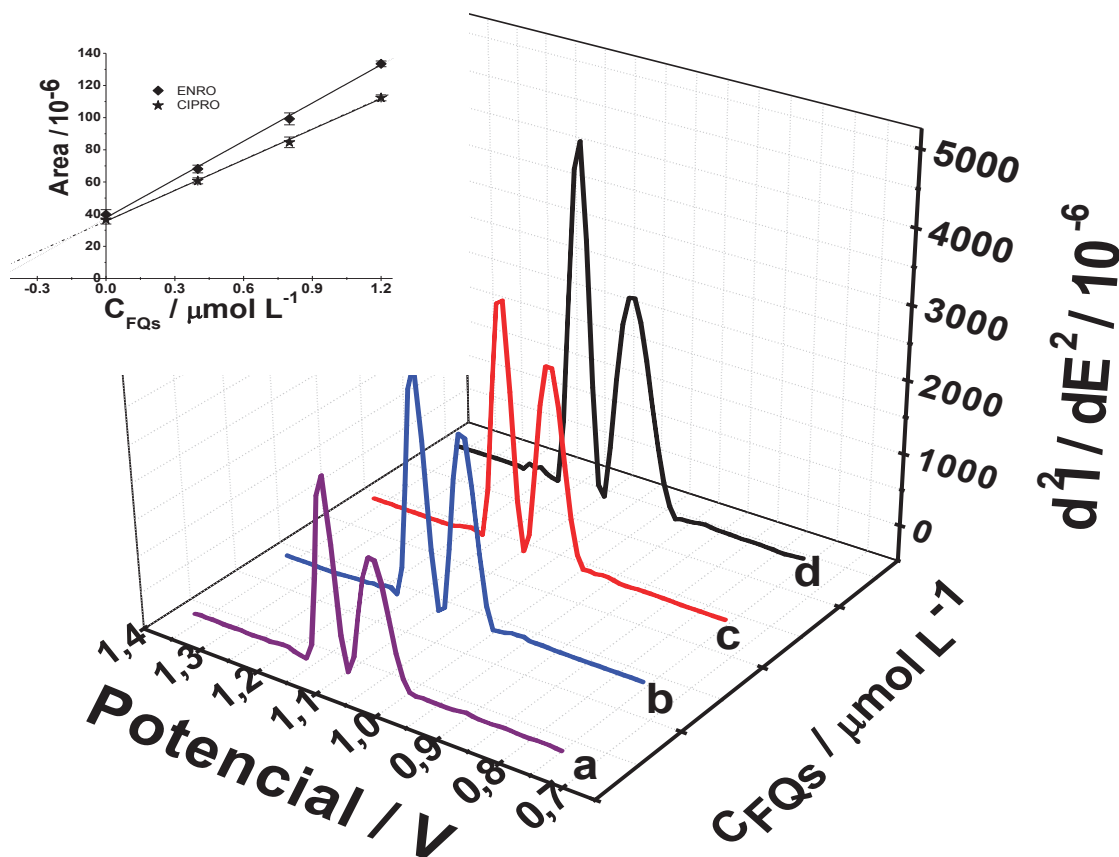


5.11 Desempenho analítico

Para testar a precisão do método de preparo de amostra - com base no procedimento MELL-AT-CS-AM - e a eletroanálise, os testes de recuperação foram

efetuados usando o método de adição padrão. A Figura 31 ilustra os voltamogramas de pulso diferencial derivativos de segunda ordem com correção da linha de base registrados após a extração das FQ da carne de frango através do procedimento MELL-AT-CS-AM (Figura 31, a) e a adição sucessiva dos analitos (Figura 31, b-d) na célula eletroquímica (Figura 31). De acordo com os resultados, o procedimento proposto foi efetivo para remover os componentes de matriz indesejados porque não há efeito de matriz significativo que comprometa a determinação das FQs CIPRO e ENRO. A linearidade adequada para a curva de adição padrão (Figura 31) foi bastante semelhante à curva analítica padrão (Figura 31), mostrando um coeficiente de correlação próximo a 0,99.

Figura 31- Voltammogramas pulso diferencial derivativos de segunda ordem corrigidos de linha de base para: (a) amostra de frango com $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ CIPRO e ENRO após uma MELL-AT-CS-AM, (bd) adições sucessivas ($20 \mu\text{L}$) de FQs ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Inserção: curva de adição padrão para as medidas de recuperação de adição.



A Tabela 12 resume os valores de recuperação que variaram entre 69,9% e 103%, para as FQs para as determinações em carne de frango e leite com fortificação das amostras variando entre 0,80, 2,00 e 4,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CIPRO e ENRO. Como pode ser visto na Tabela 12, em alguns casos, o procedimento proposto apresenta recuperação (entre 69,92% e 76,3%) para CIPRO e ENRO em amostra de leite. Esses baixos valores de recuperação podem não estar relacionados à ineficácia do método, mas com a perda do analito durante o processo de tratamento da amostra. No entanto, se o nível de concentração e a riqueza em relação à complexidade da matriz forem levados em consideração, os valores de recuperação mostram que o

procedimento funciona adequadamente e pode ser útil para outras aplicações na eletroanálise.

Tabela 12 - Resultados do ensaio de recuperação para avaliar a precisão e precisão do método proposto para quantificação de amostras de alimentos CIPRO e ENRO.

FQs	Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ^[a] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)	CV ^[c] (%)
CIPRO	Frango	0.80	0.71	89.2	11.2
	Frango	2.00	2.07	103	3.80
	Leite	4.00	2.80	69.9	4.70
	Cupim bovino	4.00	ND ^[b]	-	-
ENRO	Frango	0.80	0.64	80.5	5.95
	Frango	2.00	1.90	95.0	14.0
	Leite	4.00	3.05	76.3	1.10
	Cupim bovino	4.00	ND ^[b]	-	-

^[a] Média de quatro determinações; ^[b] Não detectado, CV = coeficiente de variação.

5.12 Comparação entre metodologia proposta no presente trabalho com outras metodologias propostas para a determinação de CIPRO e ENRO

Ao realizar a comparação do presente procedimento com a metodologia proposta pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010), podemos destacar algumas vantagens tais como: menor custo, maior rapidez no preparo das amostras assim como menor limite de detecção. Também cabe destacar que a ANVISA apresenta um procedimento para a detecção de fluoroquinolonas em medicamentos, que são amostras de fácil manipulação. Em contrapartida neste trabalho podemos efetuar a extração e pré-concentração de CIPRO e ENRO em amostras de leite e carne de frango mesmo na presença de inúmeros constituintes, tais como: gordura, proteínas, carboidratos e minerais. Os trabalhos em torno das

análises de FQs utilizam a CLAE como técnica padrão, dessa forma a separação e posterior determinação se deve ao potencial da cromatografia como técnica de separação. Quando objetiva-se utilizar a eletroanálise na determinação de FQs, o desafio é contornar a pouca seletividade dessa técnica.

A Tabela 13 apresenta diversos métodos de determinação de CIPRO e ENRO realizadas em variadas amostras. Podemos notar que as determinações são realizadas em concentrações que variam entre 1,2 e 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A determinação dos interferentes presentes nas amostras estudadas no presente trabalho só podem ser realizadas através de inúmeras análises, porém é sabido que amostras de fármacos apresentam poucos interferentes sendo de mais fácil manuseio.

Também nota-se que as análises que foram realizadas com concentração entre 0,69 e 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizaram a CLAE (técnica que apresenta boa seletividade e consequentemente apresenta considerável versatilidade em determinações em amostras complexas), ou seja, quando comparamos esses resultados obtidos no presente trabalho a técnica empregada para determinação de CIPRO e ENRO se mostra eficaz.

Tabela 13 - Parâmetros analíticos de alguns métodos eletroanalíticos e cromatográficos propostos para a determinação ENRO e CIPRO.

Amostras Líquidas						
FQs	Amostra	Eletrodo	Técnica	Adicionado/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperado / %	Referência
CIPRO	Urina	ECV-NTC	VVL	300,0	95,8	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010a)
ENRO	Urina	ECV-NTC	VVL	40,0	96,7	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010a)
CIPRO	Plasma	ECV-NTC	VVL	10,0	95,5	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010a)
ENRO	Plasma	ECV-NTC	VVL	22,0	99,8	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010a)
ENRO	Soro	-	CLAE	0,69	72,2	(Sun <i>et al.</i> , 2008)
CIPRO	Soro	-	CLAE	0,75	91,5	(Sun <i>et al.</i> , 2008)
CIPRO	Colírio	EGM	VVL	8340	91,0	(Ni, Wang e Kokot, 2006)
ENRO	Urina de cachorro	EGM	DPV	211,0	100	(Navalón <i>et al.</i> , 2002)
CIPRO	Colírio	EGM	VVL	1,2	95,4	(O'Dea <i>et al.</i> , 1990)
CIPRO	Leite	ECV	DPV	5,0	66,8	*
ENRO	Leite	ECV	DPV	5,0	61,4	*
Amostras sólidas						
FQs	Amostra	Eletrodo	Técnica	Adicionado/ $\mu\text{mol Kg}^{-1}$	Recuperado / %	Referências.
ENRO	Fezes suína	-	CLAE	0,90	97,6	(Sunderland <i>et al.</i> , 2004)
CIPRO	Fezes suína	-	CLAE	0,83	92,7	(Sunderland <i>et al.</i> , 2004)
CIPRO	Ração de patos	EGM	LSSV	2220	88,8	(Ni, Wang e Kokot, 2006)
CIPRO	Carne de frango	ECV	DPV	2,0	100,9	*
ENRO	Carne de frango	ECV	DPV	2,0	74,5	*

* Presente trabalho

Por outro lado, tem a questão ambiental. A presente técnica basicamente utiliza-se de sal (KCl), do surfactante (LSS) e de pouco volume de acetona para a extração e pré-concentração. A acetona é um solvente orgânico tóxico que, em humanos, pode causar irritações aos olhos e problemas respiratórios se não for cuidadosamente manipulada. Se descartada de maneira inadequada, pode causar impactos ambientais, levando a contaminação de águas e comprometendo a vida aquática. Porém em cada análise utiliza-se cerca de 3,5 mL que por ser uma quantidade pequena é possível um manuseio responsável que impeça qualquer tipo de contaminação. Em detrimento as análises em HPLC (apresentadas na Tabela 13) utilizam-se de quantidades consideráveis de variados solventes orgânicos tóxicos. Assim, com base no exposto, pode-se perceber vantagens na metodologia proposta, que, além de elevada sensibilidade analítica, também estão sobre o fato da metodologia MELL-AT-CS-AM apresenta m uma excelente capacidade de minimizar o processo de adsorção de contaminantes das amostras sobre a superfície do eletrodo.

O método de extração proposto MELL-AT-CS-AM forneceu uma diluição de amostra considerável para reduzir o efeito de interferências a um limiar tolerável, permitindo a pré-concentração dos analitos antes de sua quantificação em amostras de carne de frango e leite. Portanto, o procedimento de preparo de amostra adaptado funciona adequadamente e pode ter potencial não só na análise de amostras de carne e leite de frango, mas também para outras aplicações práticas na eletroanálise de outras amostras complexas de alimentos.

6.0 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento de preparo de amostra adaptado de um procedimento de Microextração Líquido-Líquido baseada em indução por sal assistida por ultrassom (MLL-ISAUS) para extração de fluoroquinolonas em amostras de alimentos de origem animal (leite e carne de frango) e determinação por eletroanálise. A escolha das melhores condições de trabalho se mostrou primordial para se obter resultados satisfatórios. Ademais, a utilização de surfactante auxiliou na amplificação do sinal analítico e melhorou a separação dos sinais sem comprometer a análise quantitativa. Além disso, os problemas provenientes da sobreposição de sinais voltamétricos das FQs foram melhores resolvidos aplicando-se métodos matemáticos como derivada de segunda ordem e correção da linha de base, o que possibilitou a distinção entre os sinais de CIPRO e ENRO e a quantificação satisfatória.

Nesse contexto o método de extração proposto MELL-AT-CS-AM forneceu uma considerável redução do efeito de interferentes levando a um limiar tolerável, permitindo a pré-concentração dos analitos antes da sua quantificação em amostras de carne de frango e leite. Portanto, o procedimento de preparo de amostra proposto funciona adequadamente para análise de amostras de carne de frango e leite. Assim, os procedimentos desenvolvidos de preparo de amostra com determinações simultâneas das fluoroquinolonas em amostras de carne de frango e leite por DPV, podem ser uma alternativa altamente satisfatória. Essas afirmações são amparadas pela maior sensibilidade e melhores valores de recuperação obtidos pelo método proposto quando comparado com análises empregando outras técnicas.

7.0 REFERÊNCIAS

ADACHI, F. *et al.* Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 444, p. 508–514, fev. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. N. DE V. S. **Farmacopéia Brasileira** MINISTÉRIO DA SAÚDE, , 2010.

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

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, 2010.

APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000a.

The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000b.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactant Systems**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1983.

BROWN, S. A. Fluoroquinolones in animal health. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 1–14, fev. 1996.

BRYSKIER, A.; CHANTOT, J.-F. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 16–28, 1995a.

Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 16–28, 1995b.

BUSH, K.; MACIELAG, M. New approaches in the treatment of bacterial infections. **Current opinion in chemical biology**, v. 4, n. 4, p. 433–439, 2000.

COBELO-GARCÍA, A. *et al.* Improving the Voltammetric Quantification of Ill-Defined Peaks Using Second Derivative Signal Transformation: Example of the Determination of Platinum in Water and Sediments. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2308–2313, 4 mar. 2014a.

Improving the Voltammetric Quantification of Ill-Defined Peaks Using Second Derivative Signal Transformation: Example of the Determination of Platinum in Water and Sediments. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2308–2313, 4 mar. 2014b.

CRANE, M. *et al.* **Veterinary medicines in the environment**. Pensacola, FL; Boca Raton [et al.: SETAC Press ; CRC Press, 2009.

DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 199–207, set. 2016.

DONE, H. Y.; HALDEN, R. U. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 10–17, jan. 2015.

EBERT, I. *et al.* Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2786–2792, dez. 2011.

ELSABEE, M.; PRANKERD, R. J. Solid-state properties of drugs. II. Peak shape analysis and deconvolution of overlapping endotherms in differential scanning calorimetry of chiral mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 86, n. 2–3, p. 211–219, out. 1992.

ENSAFI, A. A. *et al.* Simultaneous Voltammetric Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Urine and Plasma Using Multiwall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode by Least-Squares Support Vector Machines. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 7, p. 803–808, 2010a.

Simultaneous Voltammetric Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Urine and Plasma Using Multiwall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode by Least-Squares Support Vector Machines. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 7, p. 803–808, 2010b.

FERNÁNDEZ, P. *et al.* A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 88–96, mar. 2013.

FRADE, V. M. F. *et al.* Environmental contamination by fluoroquinolones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 41–54, mar. 2014a.

Environmental contamination by fluoroquinolones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 41–54, mar. 2014b.

FUKUDA, H. *et al.* Contributions of the 8-Methoxy Group of Gatifloxacin to Resistance Selectivity, Target Preference, and Antibacterial Activity against *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1649–1653, 1 jun. 2001.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, fev. 2006.

GINSBURG, A. S.; GROSSET, J. H.; BISHAI, W. R. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 7, p. 432–442, jul. 2003.

GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; GIGER, W. Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water

of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 17, p. 3645–3651, set. 2002a.

Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 17, p. 3645–3651, set. 2002b.

GORLA, F. A. *et al.* Electrochemical study for the simultaneous determination of phenolic compounds and emerging pollutant using an electroanalytical sensing system based on carbon nanotubes/surfactant and multivariate approach in the optimization. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 65–75, jan. 2016a.

Electrochemical study for the simultaneous determination of phenolic compounds and emerging pollutant using an electroanalytical sensing system based on carbon nanotubes/surfactant and multivariate approach in the optimization. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 65–75, jan. 2016b.

HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 10, 2000.

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M. D. Determination of ciprofloxacin and enrofloxacin in edible animal tissues by terbium-sensitized luminescence†. **The Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2729–2732, 1998.

HIRSCH, R. *et al.* Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 109–118, jan. 1999.

HOYER, B.; JENSEN, N. Suppression of surfactant interferences in anodic stripping voltammetry by sodium dodecyl sulfate. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 9, p. 759–764, set. 2003.

Stabilization of the voltammetric serotonin signal by surfactants. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 2, p. 323–328, fev. 2006.

HUANG, J.-F. *et al.* Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 5, p. 1228–1235, 23 fev. 2006.

JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 37–65, nov. 2011.

KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 2–13, fev. 2013.

Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 194–204, set. 2015.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, abr. 2009.

LAPARA, T. M. *et al.* Multiple Discharges of Treated Municipal Wastewater Have a Small Effect on the Quantities of Numerous Antibiotic Resistance Determinants in the Upper Mississippi River. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 19, p. 11509–11515, 6 out. 2015.

LAVINE, B. K.; WORKMAN, J. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 705–714, 15 jan. 2013.

LESHER, G. Y. *et al.* 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063–1065, 1962.

LI, X. *et al.* Influence of planting patterns on fluoroquinolone residues in the soil of an intensive vegetable cultivation area in northern China. **Science of The Total Environment**, v. 458–460, p. 63–69, ago. 2013.

LILLENBERG, M. *et al.* Presence of fluoroquinolones and sulfonamides in urban sewage sludge and their degradation as a result of composting. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 7, n. 2, p. 307–312, mar. 2010.

LUNDSTEDT, T. *et al.* Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1–2, p. 3–40, ago. 1998.

MARBÁN, G.; VU, T. T.; VALDÉS-SOLÍS, T. A simple visible spectrum deconvolution technique to prevent the artefact induced by the hypsochromic shift from masking the concentration of methylene blue in photodegradation experiments. **Applied Catalysis A: General**, v. 402, n. 1–2, p. 218–223, jul. 2011.

MURILLO PULGARÍN, J. A.; ALAÑÓN MOLINA, A.; MUÑOZ FERNÁNDEZ, L. Determination of Ciprofloxacin, the Major Metabolite of Enrofloxacin, in Milk by Isopotential Fluorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8838–8843, 8 out. 2008.

NABER, K. G. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 4, p. 331–341, 2001.

NAVALÓN, A. *et al.* Determination of the antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 454, n. 1, p. 83–91, mar. 2002.

NI, Y.; WANG, Y.; KOKOT, S. Simultaneous determination of three fluoroquinolones by linear sweep stripping voltammetry with the aid of chemometrics. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 216–225, 15 mar. 2006.

NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; HOLEN, B. Independent evaluation of a commercial deconvolution reporting software for gas chromatography mass spectrometry analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 13, p. 2056–2064, mar. 2010a.

Independent evaluation of a commercial deconvolution reporting software for gas chromatography mass spectrometry analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 13, p. 2056–2064, mar. 2010b.

Nossa capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. I–I, out. 2009.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, dez. 2009.

O'DEA, P. *et al.* Determination of ciprofloxacin by differential pulse polarography. **Electroanalysis**, v. 2, n. 8, p. 637–641, 1 nov. 1990.

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. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 6554–6562, 21 jun. 2016a.

Baseline-Corrected Second-Order Derivative Electroanalysis Combined With Ultrasound-Assisted Liquid–Liquid Microextraction: Simultaneous Quantification of Fluoroquinolones at Low Levels. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 6554–6562, 21 jun. 2016b.

PHARMACOPOEIA, B. Her Majesty's stationery office. **London, UK**, v. 1, p. 2011416, 1998.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, maio 2006.

RUTGERSSON, C. *et al.* Fluoroquinolones and *qnr* Genes in Sediment, Water, Soil, and Human Fecal Flora in an Environment Polluted by Manufacturing Discharges. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 14, p. 7825–7832, 15 jul. 2014.

SHARE, J. B. Review of drug treatment for Down's syndrome persons. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 80, n. 4, p. 388–393, jan. 1976.

SILVA, A. P. DA; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. Polarographic determination of sunscreen agents in cosmetic products in micellar media. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 679–685, 15 jan. 2006.

SILVA, R. A. B. DA *et al.* Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804, 2011.

SUN, H. *et al.* Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 2, p. 154–159, 12 set. 2008.

SUNDERLAND, J. *et al.* A reverse-phase HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig faeces. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 4, p. 390–393, abr. 2004.

TAKEMURA, M.; HAYAKAWA, I. Recent advances in the field of quinolones. **Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)**, v. 56, n. 1–2, p. 37–40, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPE. **Pharmacopeial Convention**, 1985.

TILLOTSON, G. S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. **Journal of medical microbiology**, v. 44, n. 5, p. 320–324, 1996.

TRANOS, E.; REGGIANI, A.; NIJKAMP, P. Accessibility of cities in the digital economy. **Cities**, v. 30, p. 59–67, fev. 2013.

TRINDADE, M. A. G.; ZANONI, M. V. B. Voltammetric sensing of the fuel dye marker Solvent Blue 14 by screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, n. 1, p. 257–263, abr. 2009.

VIDUEIRA FERREIRA, J. E. *et al.* The use of the k nearest neighbor method to classify the representative elements. **Educación Química**, v. 26, n. 3, p. 195–201, jul. 2015.

WANG, H.; GAO, M.; WANG, M.; *et al.* Integration of phase separation with ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction for analyzing the fluoroquinones in human body fluids by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 985, p. 62–70, mar. 2015.

WANG, H.; GAO, M.; XU, Y.; *et al.* A phase separation method for analyses of fluoroquinones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction and a new integrated device. **Meat Science**, v. 106, p. 61–68, ago. 2015a.

A phase separation method for analyses of fluoroquinones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction and a new integrated device. **Meat Science**, v. 106, p. 61–68, ago. 2015b.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry: Wang/Analytical Electrochemistry, Third Edition**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, ago. 1987.

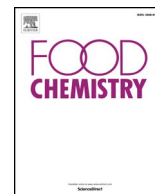
YANG, M. *et al.* Use of magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction to extract fungicides from environmental waters with the aid of experimental design methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 118–127, fev. 2016.

ZHANEL, G. G. *et al.* The new fluoroquinolones: a critical review. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 207–238, 1999.

ZHANG, X.; WEI, Y.; DING, Y. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of ciprofloxacin employing poly(alizarin red)/graphene composite film in the presence of ascorbic acid, uric acid and dopamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 835, p. 29–36, jul. 2014.

ZOU, S. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2913–2920, out. 2011.

8.0 ANEXOS



Analytical Methods

Sample preparation combined with electroanalysis to improve simultaneous determination of antibiotics in animal derived food samples



Wesley Pereira da Silva^a, Luiz Henrique de Oliveira^a, André Luiz dos Santos^c,
Valdir Souza Ferreira^d, Magno Aparecido Gonçalves Trindade^{a,b,*}

^a Faculty of Science and Technology, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados- Itahum, km 12, Dourados, MS 79804-970, Brazil

^b Unesp, National Institute for Alternative Technologies of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radioactives (INCT-DATREM), Institute of Chemistry, P.O. Box 355, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^c Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia, Rua 20, 1600 Bairro Tupã, Ituiutaba, MG 38304-402, Brazil

^d Institute of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, Caixa Postal 549, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Complex feedstuff samples
Biological sample preparation
Electroanalysis
Residual veterinary drugs

ABSTRACT

A procedure based on liquid–liquid extraction (LLE) and phase separation using magnetically stirred salt-induced high-temperature liquid-liquid extraction (PS-MSSI-HT-LLE) was developed to extract and pre-concentrate ciprofloxacin (CIPRO) and enrofloxacin (ENRO) from animal food samples before electroanalysis. Firstly, simple LLE was used to extract the fluoroquinolones (FQs) from animal food samples, in which dilution was performed to reduce interference effects to below a tolerable threshold. Then, adapted PS-MSSI-HT-LLE protocols allowed re-extraction and further pre-concentration of target analytes in the diluted acid samples for simultaneous electrochemical quantification at low concentration levels. To improve the peak separation, in simultaneous detection, a baseline-corrected second-order derivative approach was processed. These approaches allowed quantification of target FQs from animal food samples spiked at levels of 0.80 to 2.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in chicken meat, with recovery values always higher than 80.5%, as well as in milk samples spiked at 4.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with recovery values close to 70.0%.

1. Introduction

The growth of the pharmaceutical industry with consequent availability and use of large-scale veterinary antibiotics has become a global problem. Their use, to prevent or treat animal disease and to enhance production, combined with the discharge, has provided possible routes of entry of veterinary drug residues into the human food chain (Farré & Barceló, 2013; Kantiani, Llorca, Sanchís, Farré, & Barceló, 2010; Shao, Wang, Chen, & Wu, 2014) and the environment (Frade, Dias, Teixeira, & Palma, 2014). As a consequence, there has been the emergence of resistant “super-bacteria”. The contamination in the environment also results from activities of the pharmaceutical industry, which scientific studies have documented (Frade et al., 2014; Rutgersson et al., 2014). Studies developed in countries such as Brazil (Frade et al., 2014), India (Rutgersson et al., 2014), China (Li et al., 2013; Zou et al., 2011), Switzerland (Golet, Alder, & Giger, 2002), Japan (Adachi, Yamamoto, Takakura, & Kawahara, 2013), Estonia (Lillenberg et al., 2010) and the United States (Done & Halden, 2015; LaPara, Madson, Borchardt, Lang, & Johnson, 2015) show the presence of fluoroquinolones (FQ), or their

metabolites, in considerable levels in several aquatic and agricultural samples, as well as in samples of food for animals that are part of the human food chain.

There are many concerns about the direct and indirect hazards of veterinary drug use and their potential impacts on public health as well as on the natural environment. As such, between 10 and 90% of the drug dosage remains in its unchanged or non-metabolized form in tissue, or is discarded into the environment. Moreover, summarizing the findings from literature studies (Brown, 1996; Ebert et al., 2011; Hernandez-Arteseros, Compañó, & Prat, 1998; Huang, Lin, Yu, & Feng, 2006; Murillo Pulgarín, Alañón Molina, & Muñoz Fernández, 2008), it can be concluded that ciprofloxacin (CIPRO) is the major metabolite of enrofloxacin (ENRO), which can increase the concentration of the target drug in the aforementioned samples. Considering the impact of these drugs on human health, sensitive and selective analytical methodologies, especially for the quantification of residual levels in complex samples, are very important and highly desirable.

From an analytical viewpoint, complex samples have several biological constituents, such as lipids, proteins, carbohydrates (Golet et al.,

* Corresponding author at: Faculty of Science and Technology, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados- Itahum, km 12, Dourados, MS 79804-970, Brazil.
E-mail addresses: magnotr@gmail.com, magnotrindade@ufgd.edu.br (M.A.G. Trindade).

2002), and prior to analysis require several steps of preparation for the elimination of interference (Farré & Barceló, 2013). Even with separation techniques such as capillary electrophoresis (Lombardo-Agüí, García-Campaña, Gámez-Gracia, & Cruces Blanco, 2010) and high-performance liquid chromatography (Garcés, Zerzañová, Kučera, Barrón, & Barbosa, 2006; Moema, Nindi, & Dube, 2012; Turiel, Martín-Esteban, & Tadeo, 2006) the complexity of these samples has been challenging, and the sample preparation may be needed. In electroanalysis, the drawback regarding interference from complex samples is more pronounced (Bilibio, de Oliveira, Ferreira, & Trindade, 2014; de Oliveira & Trindade, 2016; Trindade, Bilibio, & Zanoni, 2014), due to the fact that the adsorption of concomitants at the electrode surface may cause the overlapping of target signals and/or a change in the ionic strength of the supporting electrolyte solution. Because of this, protein precipitation and subsequent dilution have been used to minimize this effect. However, in real samples, the concentration is very low and dilution is unfeasible.

New trends combining solid-phase and liquid-phase extraction have been documented as indispensable for sample preparation (Song et al., 2017) and pre-concentration (Sun, Qiao, Liu, & Liang, 2008). The phase separation based on magnetically stirred salt-induced liquid–liquid microextraction was used to determine five FQs in milk, chicken eggs and honey samples prior to HPLC analysis (Gao et al., 2015). Likewise, adapted methods that uses phase separation based on ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction were proposed (Wang, Gao, Wang, et al., 2015; Wang, Gao, Xu, et al., 2015) to process the samples: plasma, urine, fish, pork and beef muscle prior to determine some FQs using HPLC technique. The advantages noted when applying these methodologies were the use of less toxic solvents – in developing new applications for enhanced-solvent extractions – and the possibility to extract and preconcentrate target FQs from complex samples at very low concentration. Here, we explored the advantages highlighted in the previous reported methods to make some adaptations and study all the parameters variations using a compact device. The new device configuration allows the stirring in a hot plate and control the temperature without losses of the volatile solvent during the extraction process. The adapted method is named as phase separation based on magnetically stirred salt-induced high-temperature liquid–liquid extraction (PS-MSSI-HT-LLE).

Several electroanalytical methods have been developed for quantitation of FQs; however, the numbers are poorly reported when the application has been related to complex samples such as food samples of animal origin, especially those of solid foods. Therefore, we used the developed method, PS-MSSI-HT-LLE, to extract CIPRO and ENRO from milk and chicken meat prior to simultaneous electroanalytical determination. Target drugs are common FQ antibiotics (so called as emerging food contaminants) and were selected as model analytes. The challenge of simultaneous quantification of these two FQs was overcome by applying a correction factor to calculate the percentage of the ENRO signal overlapping the main CIPRO peak and so obtain an accurate quantification of both analytes. As for optimization of the extraction, where in some determinations the signals were almost indistinguishable, we also performed mathematical data processing using a baseline-corrected second-order derivative method.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and samples

The FQs: CIPRO and ENRO (Fig. S1, Supplementary material) were purchased from (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil) and the standard stock solutions were prepared at concentrations of 1.0 mmol L^{-1} by dissolving in 0.05% acid acetic (Vetec®, Rio de Janeiro, Brazil) and further dilution with ultrapure water. Acetic acid, phosphoric acid, sodium acetate and boric acid were purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil). The supporting electrolytes used in this work were:

acetate buffer and Britton-Robinson (BR) buffer solutions, prepared as previously reported (de Oliveira & Trindade, 2016; Trindade et al., 2014). For both buffer solutions, the concentration was 0.04 mol L^{-1} and the pH values were adjusted using hydrochloric acid or sodium hydroxide (both from Vetec®, Rio de Janeiro, Brazil) at concentrations of 0.10 mol L^{-1} .

The tested surfactants were: tetra-*n*-butylammonium bromide (TBAB), tetraethylammonium chloride (TEAC), Triton X-100 (TX-100), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), dioctyl sodium sulfosuccinate (DSS), sodium dodecyl sulfate (SDS); all purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil) and prepared using ultrapure water ($R \geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). The chicken and meat samples were acquired in local supermarkets (Dourados, MS, Brazil) and stored at 4°C during the months of January and March 2016. Prior to analysis, all samples were certified free of the target FQs.

2.2. Instrumentation

The electrochemical measurements were performed using a PGSTAT 204 potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab®, Utrecht, The Netherlands) and controlled by Nova 1.11 software. The electrochemical cell, with capacity of 5.0 mL, was composed of three conventional electrodes: Pt auxiliary electrode, Ag/AgCl_(KCl sat.) reference electrode, and a glassy carbon electrode (GCE) as the working electrode. Prior to use, the GCE was carefully polished with alumina slurry (1.0 and $0.30 \mu\text{m}$) with a polishing pad and rinsed with ultrapure water. The procedure was carefully repeated before subsequent measurements. The ultrapure water ($R \geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) used for cleaning and for preparation of all chemical solutions was obtained in a reverse-osmosis water purifier OS 10 LTXE (Gehaka®, São Paulo, Brazil) and further ultra-purified in a Thermo Scientific® system (model Smart2Pure, San Jose, USA). All measurements and/or adjustments of pH were performed using a combined glass electrode (Hanna®, model HI 1131B, Texas, United States) connected to a digital pH meter (Hanna®, model HI 3221, Texas, United States). For stirring and homogenization, a magnetic stirrer (Fisatom®, model 701, São Paulo, Brazil) was used.

2.3. Mathematical processing

For improved peak resolution in simultaneous detection, a baseline-corrected second-order derivative method was used and processed by Originlab® software (version 8.5). The mathematical data processing was fundamental to simultaneous quantification, as previously published in works by de Oliveira and Trindade (2016) as well as by Trindade et al. (2014).

2.4. Sample preparation performed to extract FQs

2.4.1. Extraction of FQs from animal food samples

Firstly, the chicken meat was cut into tiny cubes in order to present a larger contact area during the spiking process. After that, the spiked chicken meat and milk samples were prepared by adding the required amount of the working solutions (FQs), vortex shaking for approximately 5 min. and left overnight to complete the homogenization process. To evaluate the efficiency of the extraction of FQs from the samples, the procedure was developed as shown in Fig. S2 (Supplementary material), with further direct electroanalysis. As extractant solvents, HCl (0.70 mol L^{-1}) and Britton-Robinson buffer (0.04 mol L^{-1} , pH 3.00–9.00) were tested. Fig. S2 (step I, Supplementary material) shows the extraction performed, in which 0.40 g of chicken meat or milk sample containing between 0.80 and $4.00 \mu\text{mol L}^{-1}$ of CIPRO and ENRO were placed into conical tubes. Then 10 mL of extraction solvent was added and shaken by vortex for 30 s (Fig. S2, step II, Supplementary material). Subsequently, 5 mL of the supernatant was removed (Fig. S2, step III, Supplementary material) and submitted to direct electroanalysis with no further treatment (Fig. S2, step IV,

Supplementary material).

2.4.2. Proposed re-extraction using PS-MSSI-HT-LLE

To perform the PS-MSSI-HT-LLE procedure, the type and volume of extractor solvent, ionic strength by the addition of salt, the sample pH, temperature and the extraction time were used as described in previous works (Herrera-Herrera, Hernández-Borges, Borges-Miquel, & Rodríguez-Delgado, 2013; Leong, Fuh, & Huang, 2014; Pena, Silva, Pereira, Meisel, & Lino, 2010; Tolcha, Merdassa, & Megersa, 2013). By this method, 0.40 g of chicken meat or milk sample spiked with 0.80 and 4.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of CIPRO and ENRO were placed in conical tubes, vortex shaking during 3 min, and then, the procedure was performed as described in Fig. S3 (step I and II, Supplementary material). After performed steps I and II (Fig. S3, Supplementary material), 8 mL of the supernatant was removed and placed in another conical tube (capacity 15 mL) for adjustment of the pH value to 7.0, using HCl or NaOH (Fig. S3, step III). Subsequently, the ionic strength was adjusted by addition of KCl (amount varied between 5.0 and 25%, w/v) followed by manual or vortex shaking for total dissolution of the solid (Fig. S3, step IV). Then, the acetone (Vetec®, Rio Janeiro, Brazil) used as extractor solvent was added to the conical tubes (volume varied between 30 and 37.5%, v/v) and the samples were placed on the magnetic stirrer under heating at a temperature of 60 to 65 °C for 10 and 20 min, respectively, (Fig. S3, step V). After this step, the upper layer containing the acetone (the enriched phase) was collected with a microsyringe (Hamilton, São Paulo, Brazil) and added in a Beaker, (Fig. S3, step VI). The enriched organic phase was dried in a laboratory oven at 40 °C for 30 min. The residue was dissolved in 5.0 mL of the supporting electrolyte solution (BR buffer at pH 4.0) in an Eppendorf tube (Fig. S3, step VII), ultrasonicated for 10 s and the electrochemical quantification was performed using the standard addition method (Fig. S3, step VIII).

2.5. Data treatment using a factorial design

All tests were performed to demonstrate the best combination of variables, by which the optimization of the extraction procedure allowed us to randomize the variables to reduce the total number of experiments (Tables S3–S5, Supplementary material). In our study, only 41 experiments and five factors involved in the extraction step were optimized, which were: HCl concentration (0.7–1.0 mol L⁻¹), stirring time (10–20 min), volume of solvent (12.5–25% v/v), salt mass (20–30%) and temperature (60–70 °C). The choice of variables and the optimized conditions were based on previous works that covered the multivariate approach in the optimization procedure (Gorla, Duarte, Sartori, & Tarley, 2016; Yang et al., 2016).

The data analysis was performed using a 2⁵ full factorial design, performed in duplicate. In the multi-response optimization approach, used to maximize the analytical responses of ENRO and CIPRO, the applied method was based on the larger-the-better (LTB), where the result was expressed in terms of individual desirability (*di*), as described in Eq. (1) (Gorla et al., 2016). Table S4 (Supplementary material) shows the factors studied and their levels of variation as well as the results of the full factorial design.

$$di = \left(\frac{y-L}{H-L} \right) \quad (1)$$

where *y* is the main obtained experimental result related to the peak current intensity (*I_p*), *L* and *H* are the lowest and highest values obtained for *I_p* obtained for the set of experiments. In addition, the overall desirability (*Di*) was calculated by geometric mean of *di* (Eq. (2)).

$$Di = \sqrt[m]{d_1^{p_1} d_2^{p_2} \dots d_n^{p_n}} \quad (2)$$

In Eq. (2), *m* is the number of studied responses for each experiment during the optimization process and *dn* is the weight of each response. All factors and interactions were available by Pareto chart and Doehlert

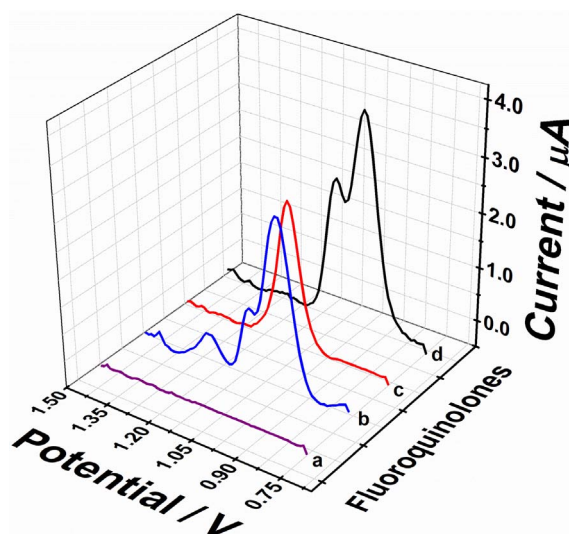


Fig. 1. Base-line corrected differential pulse voltammograms registered on the GCE for: (a) blank: buffer BR 0.04 mol L⁻¹ (pH 4.0) as supporting electrolyte, and individual electro-oxidation of (b) ENRO and (c) CIPRO as well as for the mixture of both FQs (d) all at 5.0×10^{-6} mol L⁻¹. Conditions: step potential (ΔE_s) 10 mV, pulse amplitude (ΔE) 75 mV and scan rate (ν) 10 mV s⁻¹.

matrix with a triplicate central point. Statistical analysis was performed using the StatSoft software package Statistica® 10.0 (StatSoft, Tulsa, U.S.). In all methods, a confidence level of 95% was used.

3. Results and discussion

3.1. Voltammetric studies of CIPRO and ENRO at GCE

The electro-oxidation mechanisms of FQs, CIPRO and ENRO (Fig. S1, Supplementary material), are not completely elucidated; however, previous studies have suggested that oxidation occurs at the 7-position piperazinyl group in an irreversible process. Here, in Fig. 1 is shown the voltammetric study in the absence (voltammogram a) and presence (voltammograms b–d), of CIPRO and ENRO for individual and simultaneous detection on the bare GCE. The individual detection of ENRO (voltammogram b) is characterized by the presence of three distinguishable oxidation peaks: the first one at 0.93 V, the second at 1.04 V and the third at 1.18 V (vs. Ag/AgCl_{KCl(sat.)}). However, the second peak (at 1.04 V) appears very close to the CIPRO peak (voltammogram c), because its oxidation peak occurs at 1.05 V vs. Ag/AgCl_{KCl(sat.)} and compromises simultaneous detection. Fig. 1 (voltammogram d) shows that the simultaneous electroanalysis of both FQs (with similar electroactive group) causes the overlapping peaks at 1.05 V (vs. Ag/AgCl_{KCl(sat.)}), hindering accurate peak current intensity measurement. The same condition was observed by Ensafi and co-workers (Ensafi, Taei, Khayamian, & Hasanpour, 2010) for simultaneous electroanalysis of CIPRO and ENRO. It was also shown that the mathematical processing based on the least-squares support vector machine (LS-SVM) model allowed a satisfactory peak separation for both FQs.

Once the instrumental and experimental parameters were fully optimized, as shown in Table S1 as well as the Figs. S4 and S5 (Supplementary material), the electroanalytical performance was carefully tested to detect simultaneously the target FQs. According to the optimized condition (Supplementary material), none of the alternatives used were suitable to obtain a condition in which both FQs could be detected simultaneously. Actually, there were no noteworthy improvements because the ENRO peak (at 1.04 V) remained superimposed on the CIPRO main peak and the intensification of the signal further increased the overlap. Therefore, we focused on overcoming the challenge of accurately differentiating the FQ peaks from a mixture –

during simultaneous electroanalysis – by using a mathematical data treatment.

According to previous studies (Bilibio et al., 2014; de Oliveira, Pradela, Santos, Takeuchi, & Trindade, 2015; de Oliveira & Trindade, 2016), performed with different working electrode surfaces, is not possible to measure accurately the voltammetric peaks of the FQs levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) and danofloxacin (DANO) in binary (Bilibio et al., 2014; de Oliveira et al., 2015) and ternary (de Oliveira & Trindade, 2016) mixtures, due to overlapping signals when detected simultaneously. The authors raised some alternatives by using the deconvolution and/or the second-order derivative method (Bilibio et al., 2014; de Oliveira et al., 2015) as well as the baseline-corrected second-order derivative method (de Oliveira & Trindade, 2016) in order to obtain complete separation of target signals for further simultaneous quantification. However, the aforesaid mathematical processing strategy was applied only when there were partially distinguishable peaks, and the application has not been explored to determine the ratio of interference from one peak to the other. To this end, an attractive alternative is application of the mathematical models frequently used in pulsed amperometric techniques, which have been previously used by da Silva, Tofanello Gimenes, Faria Tormin, Abarza Munoz, and Mathias Richter (2011) (Eqs. (3) and (4)).

$$I_{pCIPRO+1.05V} = I_{pCIPRO+1.05V} - (I_{pENRO+0.93V} \times CF) \quad (3)$$

$$CF = \frac{I_{pENRO+1.04V}}{I_{pENRO+0.93V}} \quad (4)$$

where I_{pCIPRO} is the peak current measured for CIPRO at 1.05 V, I_{pENRO} is the peak current measured for ENRO at 1.04 V and 0.93 V (both obtained experimentally) and CF is the correction factor obtained through the relation of I_{pENRO} at 1.04 V/0.93 V. Here, the proposed mathematical method does not intend to transform the signal, but to subtract the interfering ENRO signal from the main CIPRO signal.

3.2. Electroanalytical performance with and without PS-MSSI-HT-LLE

Using the optimized conditions as shown in Table S1 and Figs. S4 and S5 (Supplementary material) as well as the mathematical model (to subtract the ENRO signal from the CIPRO signal), the quantitative parameters of the proposed method were evaluated via an analytical curve. The analytical curves – obtained for individual and simultaneous detection of CIPRO and ENRO – were linear in the range 0.25–4.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for individual detection and 0.25–8.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for simultaneous detection, with correlation coefficient always close to 0.998 (Table S2, Supplementary material). The estimated limit of detection ranged between 0.082 (CIPRO) and 0.170 (ENRO) $\mu\text{mol L}^{-1}$. The analytical merits parameters shown in Table S2 (Supplementary material) reveals that individual and simultaneous detection can be usefully made, even though the partially overlapping FQ peaks problem has not been fully solved.

The monitoring of veterinary drug residues in animal-food products plays a very important role in the food security area, since it helps the regulatory agencies in food inspection services protect people from contaminated food. Food products are very complex samples which usually require efficient sample pretreatment procedures, not only to extract the analyte, but also to avoid interference from the constituents of the sample matrix, such as lipids, proteins, carbohydrates and several other biological constituents. Despite the need for sample preparation of complex food of animal origin, from the electroanalytical view point the sample preparation is a very tedious and complex step. In this case, direct electroanalysis after FQ extraction from animal food samples would be an attractive alternative to overcome this problem. Initially, aiming at reducing the number of experimental steps, we tested the extraction of FQs using only hydrochloric acid (at 0.7 mol L^{-1} , Fig. 2, voltammogram a) and Britton-Robinson (BR) buffer (at 0.04 mol L^{-1} , pH 4.0, Fig. 2, voltammogram b) solutions for further electroanalysis

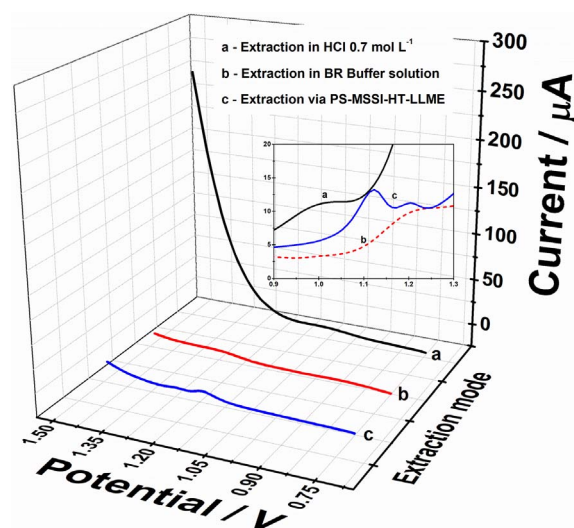


Fig. 2. DP voltammograms registered for electro-oxidation of CIPRO and ENRO at 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, for different extractions procedures: (a) HCl 0.7 mol L^{-1} , (b) Buffer BR and (c) PS-MSSI-HT-LLE as supporting electrolyte, BR buffer (at 0.04 mol L^{-1} pH 5.0). Conditions: $\Delta E_s = 10$ mV, $\Delta E = 75$ mV and $\nu = 10$ mV s^{-1} , in sample of chicken.

with no additional sample pretreatment, as described in Section 2.4.1. The voltammetric profiles showed only one broad wave – at 1.00 V (Fig. 2, voltammogram a) and 1.21 V (Fig. 2, voltammogram b) – with poor definition of both FQ peaks. This is indicative of a strong matrix effect from several biological constituents that culminated with electrode-surface fouling and consequently the inhibition of FQ signals.

In contrast, the use of the PS-MSSI-HT-LLE procedure (as in experimental Section 2.4.2) before electroanalysis improved the voltammetric profile, allowing the separation of overlapped FQ signals and individual analyte peak intensity measurement (Fig. 2, voltammogram c). Here, the proposed PS-MSSI-HT-LLE method allows us to submit the extracted analytes to a high dilution in aqueous phase to disperse the matrix concomitants along with the sample medium to reduce undesired matrix components and their effect on fouling the electrode surface. Meanwhile, the PS-MSSI-HT-LLE procedure provides the dispersion of the low-density extractor solvent (acetone) into the sample medium, enabling re-extraction of target FQs in a preconcentrated level to reach the desired concentration for further detection via electroanalytical techniques. However, as the meat samples were of a complex mixture we carried out the same process to verify whether the performed procedure was valid. In addition, as this process involves many variables and several experimental steps, we used several strategies to optimize the PS-MSSI-HT-LLE procedure and to overcome the problem of interference in a complex sample. It can be seen in the sequence that the optimization was based on the adaptation of previously published procedures involving the use of sample preparation prior to FQ detection via chromatographic techniques (Gao et al., 2015; Wang, Gao, Wang, et al., 2015; Wang, Gao, Xu, et al., 2015).

3.3. Evaluation of extraction parameters for the proposed PS-MSSI-HT-LLE method

To minimize the number of measurements and to make the extraction process faster, cheaper and reliable, a 2^5 full-factorial design was used as described in experimental Section 2.5. Table S3 (Supplementary material) shows the parameters and the studied variables, as well as their respective levels used to evaluate the PS-MSSI-HT-LLE procedure, in which their performance (average of two repetitions) were evaluated by means of the peak current intensity. The results applied in the Pareto chart Fig. S6 (Supplementary material), with the 95% confidence level, show interactions between temperature and salt, with values of 2.38 for ENRO and 3.29 for CIPRO, which target

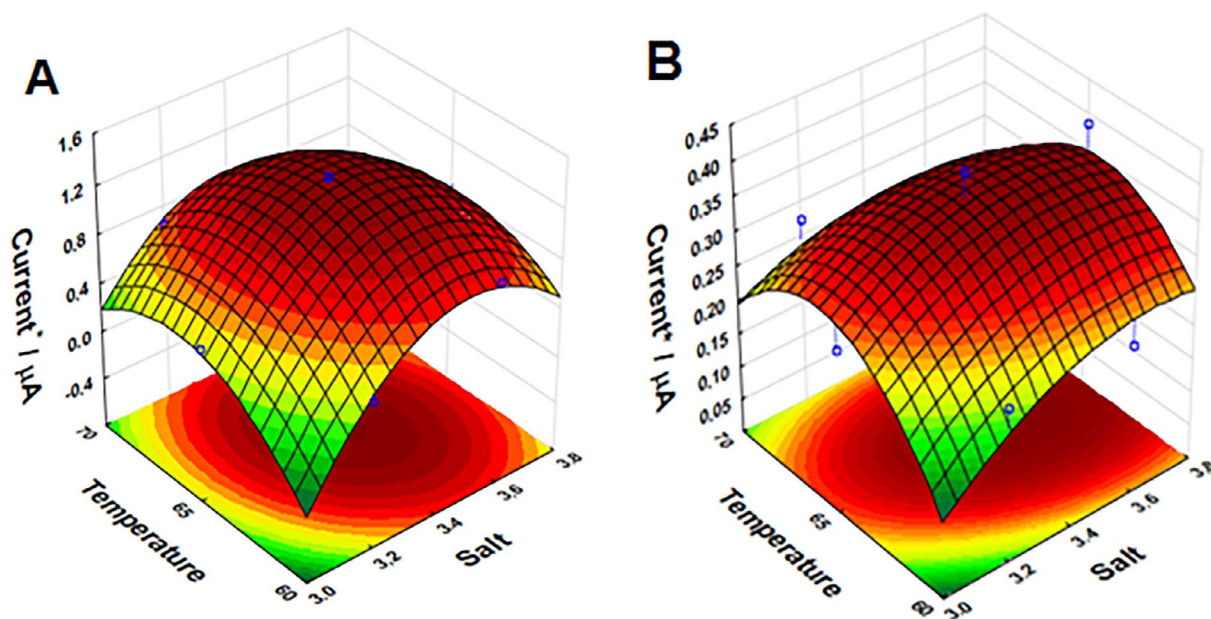


Fig. 3. Response surface for ENRO (A) CIPRO (B) obtained for factors salt and temperature. * Desirability current obtained as Table S5 (Supplementary material).

values indicate positive effects to high levels.

According to Fig. S6 (Supplementary material), the interactions between the other variables were not significant, since all these presented negative values. Thus, the lower levels of acetone and HCl were adopted. The analysis of variance (ANOVA) showed acceptable regression coefficients and it was observed that these models were suitable for application to the data because the lack of adjustment was not significant (at 95% confidence level). This finding was verified from the F-test, Table S4 (Supplementary material), where the ratios $MS_{\text{lack of fit}}/MS_{\text{pure error}}$ for the quadratic were 7.99 (CIPRO) and 2.35 (ENRO), not exceeding the tabulated value (18.51, Table S4, Supplementary material) at the 95% confidence level. The most significant variables (salt and temperature) were optimized using the central point method using a Doehlert matrix, as presented in Table S5 (Supplementary material).

The Fig. 3 shows the response surfaces applied to the aforesaid main variable effects (KCl and temperature) and Table 1 summarizes the conditions optimized to perform the proposed PS-MSSI-HT-LLE procedure and to maximize its extraction efficiency. It can be pointed out that in the analysis of food samples of animal origin, although acetone (medium polarity) could extract medium-polarity compounds together with target analytes, this solvent did not extract significant amount of fats, as was usually observed in non-polar solvents (e.g., hexane, cyclohexane and octanol).

Table 1

Information regarding the optimized parameters in the PS-MSSI-HT-LLE procedure shown in experimental Section 2.4.2.

Parameters	Type and/or interval tested	Optimized
<i>Previous extraction</i>		
HCl concentration, mol L ⁻¹	0.7–1.0	0.7
Solution to adjust the pH	HCl, NaOH	Both
<i>Re-extraction – PS-MSSI-HT-LLE</i>		
Salt	KCl, LiCl, MgCl, MgSO ₄	KCl
Acetone amount, %	30 and 37.5	33.75
Salt mass, %	20–30	25
Solution to adjust the pH	HCl, NaOH	Both
Extraction time, min	10–20	20
Temperature, °C	60–70	65
Extractor solvent	Buffer Acetate, BR, HCl	HCl
Sample pH	1.0–10.0	7.0

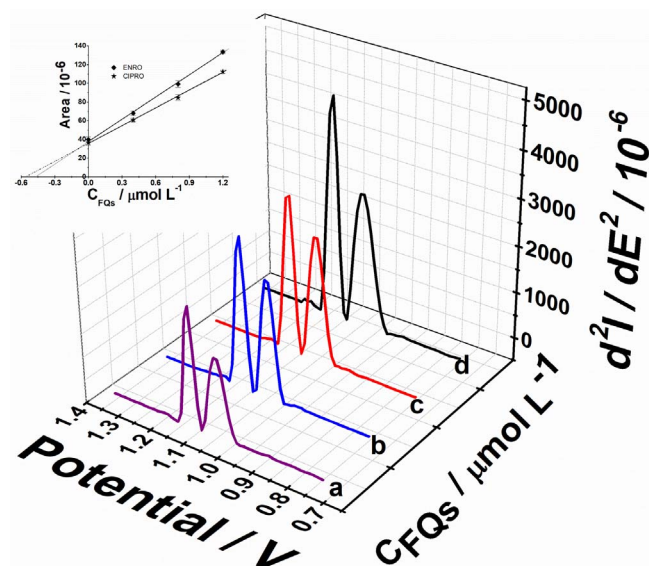


Fig. 4. Baseline-corrected second-order derivative DP voltammograms for: (a) chicken sample spiked with $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ CIPRO and ENRO after a PS-MSSI-HT-LLE, (b–d) successive additions of $20 \mu\text{L}$ of FQ solutions (1.0 mmol L^{-1}). Inset: Standard addition curve for the addition-recovery measurements. Condition: as in Supplementary material as well as in Fig. 2 and Table 1.

3.4. Samples analysis

To assay the accuracy of the combined sample preparation – based on the PS-MSSI-HT-LLE procedure – and the electroanalysis, the recovery tests were evaluated using the standard-addition method. Fig. 4 illustrates the DP baseline-corrected second-order derivative voltammograms recorded after FQ extraction from chicken meat via the PS-MSSI-HT-LLE procedure (Fig. 4, voltammogram a) and the successive addition of the target analytes (Fig. 4, voltammograms b–d) to the electrochemical cell to achieve the analytical quantification (Fig. 4, inset). According to the results, our proposed procedure was effective in removing the undesired matrix components because there was no significant matrix effect that compromised the accurate determination of target FQs. The proper linearity for the standard addition curve (Fig. 4,

Table 2

Results of recovery assay to assess the accuracy and precision of the proposed method for quantification CIPRO and ENRO food samples.

FQs	Sample	Added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Found ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD ^b (%)
CIPRO	Chicken meat ^b	0.80	0.71	89.2	11.2
		2.00	2.07	103	3.80
	Milk	4.00	2.80	69.9	4.70
ENRO	Chicken meat ^a	0.80	0.64	80.5	5.95
		2.00	1.90	95.0	14.0
	Milk	4.00	3.05	76.3	1.10

^a average of three determinations.

^b relative standard deviation.

inset) was quite similar to the standard analytical curve (Table S2, Supplementary material), showing a correlation coefficient close to 0.99.

Table 2 summarizes the recovery values, ranging between 69.9 and 103%, for extracted target FQs from chicken meat and milk samples spiked with 0.80, 2.00 and 4.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of CIPRO and ENRO. As can be seen in Table 2, in some cases, the proposed procedure yielded poor recovery (ranging between 69.9 and 76.3%) for CIPRO and ENRO in milk samples; the low recovery values may not be related to the ineffectiveness of the method, but rather to the loss of analytes during the sample-handling process. However, if the level of concentration and high matrix complexity is taken into account, the recovery values show that the procedure works properly and can be useful for further applications in electroanalysis.

4. Conclusion

We have shown an adapted sample preparation procedure based on the PS-MSSI-HT-LLE for use in the extraction of FQs from complex food samples of animal origin before their successful quantification by electroanalytical techniques. In addition, the problems of overlapping FQ voltammetric signals were solved by applying a mathematical method using a correction factor and a baseline-corrected second-order derivative approach, making possible their simultaneous detection. The PS-MSSI-HT-LLE extraction method provides considerable sample dilution in order to reduce the effect of interferences to below a tolerable threshold, allowing the pre-concentration of target analytes prior to their quantification in chicken meat and milk samples. Therefore, the adapted sample preparation procedure works properly and can be a potential application not only in the analysis of chicken meat and milk samples but also for further practical applications in the electroanalysis of other complex feedstuff samples.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Brazilian funding agency: National Council for Scientific and Technological Development – CNPq – Brazil (contract: 402832/2016-7) and Brazilian Federal Agency for the Improvement of Higher Education – CAPES – Brazil (contract: 88881.119436/2016-01), CNPq – Brazil (contract: 402832/2016-7), CNPq/INCT – Brazil (contract: 465571/2014-0) and also UFGD.

Disclosure of competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.041>.

References

- Adachi, F., Yamamoto, A., Takakura, K.-I., & Kawahara, R. (2013). Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 444, 508–514.
- Bilibio, U., de Oliveira, L. H., Ferreira, V. S., & Trindade, M. A. G. (2014). Enhanced simultaneous electroanalytical determination of two fluoroquinolones by using surfactant media and a peak deconvolution procedure. *Microchemical Journal*, 116, 47–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.04.009>.
- Brown, S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(1), 1–14. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00001.x>.
- da Silva, R. A. B., Tofanello Gimenes, D., Faria Tormin, T., Abarza Munoz, R. A., & Mathias Richter, E. (2011). Batch injection analysis with amperometric detection: Application for simultaneous analysis using a single working electrode. *Analytical Methods*, 3(12), 2804–2808. <http://dx.doi.org/10.1039/C1AY05395G>.
- de Oliveira, L. H., Pradela, L. A., Santos, A. L., Takeuchi, R. M., & Trindade, M. A. (2015). Mathematical processing comparison of voltammetric data: Application with the simultaneous determination of fluoroquinolones. *Química Nova*, 38(10), 1300–1306.
- de Oliveira, L. H., & Trindade, M. A. G. (2016). Baseline-corrected second-order derivative electroanalysis combined with ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction: Simultaneous quantification of fluoroquinolones at low levels. *Analytical Chemistry*, 88(12), 6554–6562. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01379>.
- Done, H. Y., & Halden, R. U. (2015). Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. *Journal of Hazardous Materials*, 282, 10–17.
- Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., & Schlüter, C. (2011). Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12), 2786–2792.
- Ensafi, A. A., Taei, M., Khayamian, T., & Hasanpour, F. (2010). Simultaneous voltammetric determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in urine and plasma using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode by least-squares support vector machines. *Analytical Sciences*, 26(7), 803–808. <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.26.803>.
- Farré, M., & Barceló, D. (2013). Analysis of emerging contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 240–253.
- Frade, V. M. F., Dias, M., Teixeira, A. C. S. C., & Palma, M. S. A. (2014). Environmental contamination by fluoroquinolones. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502011000100004>.
- Gao, M., Wang, H., Ma, M., Zhang, Y., Yin, X., Dahlgren, R. A., & Wang, X. (2015). Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid-liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food. *Food Chemistry*, 175, 181–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.132>.
- Garcés, A., Zetzañová, A., Kučera, R., Barrón, D., & Barbosa, J. (2006). Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection: Application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A*, 1137(1), 22–29.
- Golet, E. M., Alder, A. C., & Giger, W. (2002). Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 36(17), 3645–3651.
- Gorla, F. A., Duarte, E. H., Sartori, E. R., & Tarley, C. R. T. (2016). Electrochemical study for the simultaneous determination of phenolic compounds and emerging pollutant using an electroanalytical sensing system based on carbon nanotubes/surfactant and multivariate approach in the optimization. *Microchemical Journal*, 124, 65–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.021>.
- Hernandez-Arteseros, J. A., Compañó, R., & Prat, M. D. (1998). Determination of ciprofloxacin and enrofloxacin in edible animal tissues by terbium-sensitized luminescence. *Analyst*, 123(12), 2729–2732.
- Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75, 130–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.026>.
- Huang, J.-F., Lin, B., Yu, Q.-W., & Feng, Y.-Q. (2006). Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(5), 1228–1235. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-005-0270-8>.
- Kantiani, L., Llorca, M., Sanchís, J., Farré, M., & Barceló, D. (2010). Emerging food contaminants: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3944-9>.
- LaPara, T. M., Madson, M., Borchardt, S., Lang, K. S., & Johnson, T. J. (2015). Multiple discharges of treated municipal wastewater have a small effect on the quantities of numerous antibiotic resistance determinants in the upper Mississippi river. *Environmental Science & Technology*, 49(19), 11509–11515.
- Leong, M.-I., Fuh, M.-R., & Huang, S.-D. (2014). Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1335, 2–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>.
- Li, X., Xie, Y., Wang, J., Christakos, G., Si, J., Zhao, H., & Li, J. (2013). Influence of planting patterns on fluoroquinolone residues in the soil of an intensive vegetable cultivation area in northern China. *Science of the Total Environment*, 458, 63–69.
- Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Löhms, R., & Litvin, S. V. (2010). Presence of fluoroquinolones and sulfonamides in urban sewage sludge and

- their degradation as a result of composting. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(2), 307–312.
- Lombardo-Aguí, M., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., & Cruces Blanco, C. (2010). Laser induced fluorescence coupled to capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolones in foods of animal origin using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1217(15), 2237–2242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.016>.
- Moema, D., Nindi, M. M., & Dube, S. (2012). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 730, 80–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.036>.
- Murillo Pulgarín, J. A., Alañón Molina, A., & Muñoz Fernández, L. (2008). Determination of ciprofloxacin, the major metabolite of enrofloxacin, in milk by isopotential fluorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8838–8843.
- Pena, A., Silva, L. J. G., Pereira, A., Meisel, L., & Lino, C. M. (2010). Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(6), 2615–2621. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3819-0>.
- Rutgersson, C., Fick, J., Marathe, N., Kristiansson, E., Janzon, A., Angelin, M., & Larsson, D. G. J. (2014). Fluoroquinolones and qnr genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges. *Environmental Science & Technology*, 48(14), 7825–7832. <http://dx.doi.org/10.1021/es501452a>.
- Shao, Y., Wang, J., Chen, X., & Wu, Y. (2014). The consolidation of food contaminants standards in China. *Food Control*, 43, 213–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.017>.
- Song, Y. P., Zhang, L., Wang, G. N., Liu, J. X., Liu, J., & Wang, J. P. (2017). Dual-dummy-template molecularly imprinted polymer combining ultra performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones and sulfonamides in pork and chicken muscle. *Food Control*, 82, 233–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.002>.
- Sun, H., Qiao, F., Liu, G., & Liang, S. (2008). Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Analytica Chimica Acta*, 625(2), 154–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.025>.
- Tolcha, T., Merdassa, Y., & Megersa, N. (2013). Low-density extraction solvent based solvent-terminated dispersive liquid–liquid microextraction for quantitative determination of ionizable pesticides in environmental waters. *Journal of Separation Science*, 36(6), 1119–1127. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200849>.
- Trindade, M. A. G., Bilibio, U., & Zanon, M. V. B. (2014). Enhancement of voltammetric determination of quinizarine based on the adsorption at surfactant-adsorbed-layer in disposable electrodes. *Fuel*, 136, 201–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.044>.
- Turiel, E., Martín-Esteban, A., & Tadeo, J. L. (2006). Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Analytica Chimica Acta*, 562(1), 30–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.054>.
- Wang, H., Gao, M., Wang, M., Zhang, R., Wang, W., Dahlgren, R. A., & Wang, X. (2015). Integration of phase separation with ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction for analyzing the fluoroquinolones in human body fluids by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 985, 62–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.012>.
- Wang, H., Gao, M., Xu, Y., Wang, W., Zheng, L., Dahlgren, R. A., & Wang, X. (2015). A phase separation method for analyses of fluoroquinolones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction and a new integrated device. *Meat Science*, 106, 61–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.023>.
- Yang, M., Wu, X., Jia, Y., Xi, X., Yang, X., Lu, R., & Zhou, W. (2016). Use of magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction to extract fungicides from environmental waters with the aid of experimental design methodology. *Analytica Chimica Acta*, 906, 118–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.019>.
- Zou, S., Xu, W., Zhang, R., Tang, J., Chen, Y., & Zhang, G. (2011). Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities. *Environmental Pollution*, 159(10), 2913–2920. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.037>.