

LUIZA DUMONT DE MIRANDA MORAES

**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS
EM ÁGUAS USANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M827m
2019
Moraes, Luiza Dumont de Miranda, 1989-
Método para determinação de fluorquinolonas em águas
usando nanopartículas de prata / Luiza Dumont de Miranda
Moraes. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 74 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Renata Pereira Lopes Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-72.

1. Espectrofotometria. 2. Antibióticos. 3. Ressonância
plasmônica de superfície. 4. Água potável - Contaminação.
5. Luz - Espalhamento. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. II. Título.

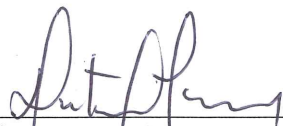
CDD 22. ed. 543.55

LUIZA DUMONT DE MIRANDA MORAES

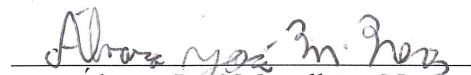
**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS
EM ÁGUAS USANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

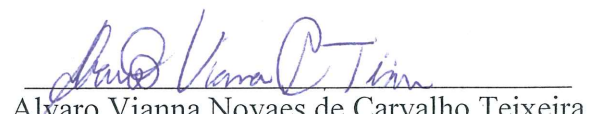
APROVADA: 25 de fevereiro de 2019.



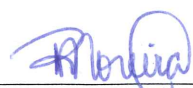
Antônio Augusto Neves



Alvaro José Magalhães Neves



Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira
(Coorientador)



Renata Pereira Lopes Moreira
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pela torcida e por tornarem possível meus estudos e formação profissional. Ao meu noivo e minha irmã pelo encorajamento e apoio. Dedico também à prof^a Renata, pela consideração e pelo entusiasmo com a pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pela vida, pelas incontáveis bênçãos e pela proteção e amparo permanente, e que sem Ele nada seria possível.

À minha orientadora, Dr. Renata Pereira L. Moreira, e aos meus coorientadores Dr. Alvaro Vianna N. de C. Teixeira e Dr. André Fernando de Oliveira, pela compreensão, assistência, incentivo e orientação durante toda essa jornada.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, especialmente, a Paloma e Mariane, pela amizade e apoio, e o Tiago, Gabi, Yuri, Giovanna, Lucas, Ana Luísa pelo convívio e consideração.

Aos colegas de outros laboratórios, que conheci durante o mestrado, pelos bate-papos e pela ajuda, sobretudo a Cris, a Luísa e o Kaíque.

Ao meu noivo, Gelmer, pelo amor, motivação e encorajamento constantes; pela companhia sempre presente na minha vida.

Aos meus pais e irmã, pelo amor, compreensão, motivação, conselhos, apoio, e principalmente, pela torcida.

À Universidade Federal de Viçosa e aos profissionais do Departamento de química da UFV, em especial a secretaria de pós-graduação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram e me apoiaram nesta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
FIGURAS DO ANEXO	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1: Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos	1
1.1. Introdução	2
1.2. Revisão da literatura.....	3
1.2.1. Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs) no meio ambiente.....	3
1.2.2. Antibióticos	4
1.2.2.1. Fluoroquinolonas	5
1.2.2.2. Contaminação no meio ambiente por fluoroquinolonas	9
1.2.2.2.1. Fontes de aplicação humana.....	10
1.2.2.2.2. Fontes de aplicação veterinária.....	11
1.2.3. Nanopartículas metálicas	14
1.2.3.4. Ressonância plasmônica localizada de superfície (RPLS)	16
1.2.3.5. Nanosensores de prata (NPsAg)	21

1.2.3.7. Estabilizantes de NPsAg	25
1.2.3.8. Técnicas de caracterização de nanopartículas	27
1.2.3.8.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	29
1.2.3.8.2. Espectrofotometria de Absorção Molecular (EAM – UV/Vis)	
31	
1.2.4. Validação de métodos analíticos	32
1.2.4.1. Seletividade.....	32
1.2.4.2. Faixa linear de trabalho	32
1.2.4.3. Veracidade.....	33
1.2.4.4. Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária)	33
1.2.4.5. Limite de Detecção.....	34
1.2.4.6. Limite de Quantificação	34
1.2.4.7. Robustez.....	34
1.3. OBJETIVO GERAL.....	35
1.3.1. Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO 2: Materiais e Métodos	36
2.1. Padrões e Reagentes.....	37
2.2. Equipamentos	37
2.3. Preparo das Soluções	37
2.4. Síntese dos Nanosensores.....	38
2.5. Caracterização das nanopartículas de prata	38

2.6.	Estabilização das NPsAg com glutathiona	39
2.7.	Cinética das reações	39
2.8.	Nanosensores de fluoroquinolonas.....	39
2.8.1.	Desenvolvimento e validação do método.....	39
CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão		42
3.1.	Síntese e caracterização das NPsAg.....	43
3.2.	Detecção das fluoroquinolonas	45
3.3.	Estudo de estabilização das NPsAg	50
3.4.	Cinética de reação das NPsAg estabilizadas.....	53
3.5.	Validação do método de quantificação de fluoroquinolonas por NPsAg.....	55
3.6.	Aplicação do método em uma amostra autêntica.....	60
4.	CONCLUSÃO.....	63
5.	PERSPECTIVAS	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
7.	ANEXOS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CE** - Contaminantes emergentes
- CIP** – Ciprofloxacina
- CV** – Coeficiente de Variação
- DLS** – Espalhamento dinâmico de luz
- DP** - Desvio Padrão
- EAM-UV/Vis** - Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV/Vis
- ERNO** – Enrofloxacin
- FQs** – Fluoroquinolonas
- GSH** – Glutathione
- ITU** - Infecções do trato urinário
- LD** - Limite de detecção
- LQ** - Limite de quantificação
- NOR** – Norfloxacina
- NPs** – Nanopartículas
- NPsAg** – Nanopartículas de prata
- RPLS** – Ressonância plasmônica localizada de superfície
- RP**– Ressonância plasmônica
- SP** – Superfície plasmônica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido nalidíxico (ácido 1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridino-3-carboxílico).....	5
Figura 2. Esquema dos tipos de sínteses de nanomateriais (Adaptado de HORIKOSHI; SERPONE, 2016).....	15
Figura 3. Esquema da interação de luz com uma NP metálica (Adaptado de GARCIA, 2011).....	18
Figura 4: Espectro de absorção óptica correspondente a NPs de prata de 10 nm (Adaptado de GARCIA, 2011).....	22
Figura 5. (a) Suspensões coloidais de nanopartículas de prata apresentando variações de cores em função do tamanho das nanopartículas. (b) Espectros de absorção para as suspensões coloidais de NPs _{Ag} em (a) (Adaptado de MURPHY; JANA, 2002).	23
Figura 6. Representação esquemática da estabilização das NPs _{Ag} por forças repulsivas devido à presença de íons borohidreto (Adaptado de SOLOMON <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figura 7. Estrutura da glutathiona.....	26
Figura 8. Esquema de estabilização das nanopartículas de prata com glutathiona (adaptado de BALAVANDY <i>et al.</i> , 2014).....	27
Figura 9. Espectro UV/Vis da dispersão coloidal de nanopartículas de prata (teor $8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) com banda de ressonância plasmônica em ~400 nm.	43
Figura 10. Função de correlação da intensidade da luz espalhada normalizada em função do tempo das NPs _{Ag} ($1,25 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹), • (NPs _{Ag} filtradas), ■ (NPs _{Ag} não filtradas) e as linhas contínuas correspondem ao ajuste nas respectivas cores.	44
Figura 11. Representação das distribuições de tamanhos das NPs _{Ag} não-filtradas (a) e as NPs _{Ag} filtradas (b).	45
Figura 12. Espectros UV/Vis das NPs _{Ag} ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) com deslocamento da RPS de 400 para ~530 nm na presença de CIP (variando de 0 a $8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹). As setas	

indicam os λ mencionados. Inset: Fotografia das NPsAg puras (a) NPsAg com CIP (b).	46
Figura 13 Espectros UV/Vis das NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com deslocamento da RPS de 400 para 530 nm na presença de NOR (variando de 0 a $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). As setas indicam os λ mencionados. Inset: Fotografia das NPsAg puras (a) NPsAg com NOR (b).....	46
Figura 14. Representação esquemática do mecanismo de agregação das NPsAg responsável pela determinação de FQs (Adaptado de XU et al., 2011).....	48
Figura 15. Curvas de correlação da intensidade da luz espalhada normalizadas em função do tempo das NPsAg ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e CIP ($6,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (a). As linhas contínuas mostram o ajuste pelo modelo NNLS. Aumento do diâmetro das NPsAg na presença de CIP em função do tempo (b).	49
Figura 16. Curvas de correlação da intensidade da luz espalhada normalizadas em função do tempo das NPsAg ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) estabilizadas com GSH ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e CIP ($6,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (a). Variação do diâmetro das NPsAg na presença de CIP (b).	50
Figura 17: Espectro da ciprofloxacina em diferentes concentrações na presença de GSH (A). Estudo comparativo entre o comportamento das curvas (■) com GSH e (●) sem GSH (b) em 400 nm (B). Inset: Fotografia das nanopartículas de prata (a) com ciprofloxacina (b) e com ciprofloxacina e GSH (c).....	52
Figura 18. Mecanismo de alteração da excitação de plasmons das nanopartículas estabilizadas pela glutathione induzidas pelas fluoroquinolonas.	52
Figura 19. Mecanismo de interação cátion- π entre um grupo positivamente carregado da GSH e o anel aromático da ciprofloxacina.	53
Figura 20: Estudo cinético das NPsAg. Comprimento de onda monitorado em 400 nm (■) e deslocamento de banda de meia altura (■) em função do tempo. Condições de análise: NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), GSH ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e CIP ($2,78 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Inset mostra como foi medido o $\lambda_{\text{ABS}}/2$	53

Figura 21: Estudo da interação das NPsAg. Comprimento de onda monitorado 400 nm. Condições de análise: NPsAg ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹), GSH ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e CIP nas concentrações de (●) $1,94 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ e (●) $2,08 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	55
Figura 22: Curvas analíticas monitoradas em 400 nm por EAM-UV/Vis no primeiro dia. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ GSH.	56
Figura 23. Fotografia das NPsAg com diferentes fármacos para ensaio de seletividade: (a) amoxicilina, (b) cafeína, (c) cefadroxil, (d) cefalexina, (e) ceftriaxona, (f) penicilina G e (g) ciprofloxacina. Condições de análise: $2,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ para fármacos e nanopartículas.	59
Figura 24. Estudo de seletividade das NPsAg, que mostram as absorvâncias em 400 nm das NPsAg na presença dos fármacos testados ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) (n=3). Os valores foram obtidos em torno de 20s, com adição dos fármacos às NPsAg. (a) apenas com NPsAg; (b) NPsAg estabilizadas com GSH.	60
Figura 25. Curvas analíticas da ciprofloxacina em água tipo 1 (preto) e amostra de água (roxo) com superposição de matriz (a). Espectros das amostras usadas em “a” (b). Teor das NPsAg $1,09 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; [GSH]= $5,43 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . Insert: Gráfico de resíduos.	61

FIGURAS DO ANEXO

- Figura A1. Curva analítica do primeiro dia da ciprofloxacina na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $3,47 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.....73
- Figura A2. Curva analítica do primeiro dia da Norfloxacin na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.73
- Figura A3. Curva analítica do primeiro dia da Enrofloxacin na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.74
- Figura A4. Curva analítica com superposição de matriz (água tratada) para CIP. Teor das NPsAg $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; [GSH]= $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Insert: Gráfico de resíduos.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espectro simplificado de atividade das fluoroquinolonas em ausência de resistências adquiridas (REVEST; TATTEVIN, 2014)	6
Tabela 2. Principais técnicas usadas na caracterização de nanopartículas. (Adaptado de PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).....	28
Tabela 3: Reagentes utilizados neste trabalho.	37
Tabela 4: Equipamentos utilizados.	37
Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos pelo método de quantificação de FQs por NPsAg no primeiro dia.....	57
Tabela 6. Coeficientes de determinação para a curva analítica de cada fármaco, nos três diferentes dias, empregando o método de determinação de fluoroquinolonas por NPsAg.	57
Tabela 7. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária para o método de determinação colorimétrica de fluoroquinolonas em água empregando NPsAg.	57
Tabela 8: Comparação de outros métodos de determinação de FQs em águas.....	58
Tabela 9. Parâmetros analíticos obtidos pelo método de quantificação de CIP por NPsAg em uma amostra autêntica de água.	61
Tabela 10. Veracidade e repetitividade para o método de determinação colorimétrica de fluoroquinolonas em água tratada empregando NPsAg.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estruturas, gerações, massa molar, uso e características das FQs detectadas no meio ambiente (VAN DOORSLAER et al., 2014).	7
Quadro 2. Propriedades físico-químicas da norfloxacin (NOR)	12
Quadro 3. Propriedades físico-químicas da ciprofloxacina (CIP)	13
Quadro 4. Propriedades físico-químicas da enrofloxacin (ENRO)	14

RESUMO

MORAES, Luiza Dumont de Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Método para determinação de fluoroquinolonas em águas usando nanopartículas de prata** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira. Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira.

As fluoroquinolonas pertencem a uma das classes de antibióticos mais prescritas, devido à sua atividade antibacteriana de amplo espectro, combatendo diversas infecções tanto em humanos como em animais. Porém, seu uso indiscriminado e devido sua ação contra variados tipos de bactérias pode gerar resistência bacteriana de uma forma mais generalizada. Além do mais, podem ser absorvidas nos tecidos de animais e excretadas em certas proporções, nas suas formas não-metabolizadas, podendo causar contaminação na ingestão de alimentos cárneos, e também ambiental. É relatada na literatura a contaminação de efluentes e até água tratada com esses antibióticos. Portanto, neste trabalho, propõe-se um método de determinação de fluoroquinolonas a partir do uso de nanopartículas de prata (NPsAg) estabilizadas com glutathione (GSH) como nanosensores colorimétricos para a ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENRO) e a norfloxacina (NOR) em sistemas aquosos. As NPsAg foram estabilizadas com GSH (NPsAg-GSH) e caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espectrofotometria de absorção molecular (EAM-UV/Vis), e realizados ensaios monitorando a diminuição da banda de ressonância plasmônica localizada de superfície (RPLS), em 400 nm, e o deslocamento batocrômico da banda de absorção. O método foi validado, sendo determinada a faixa linear de trabalho na região entre $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ENRO e NOR, e de $6,94 \times 10^{-6}$ a $3,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para CIP. A performance analítica do método foi validada e os resultados foram satisfatórios, com recuperações entre 83,7 e 110% (exceto a CIP no terceiro dia que obteve 73,8%) e repetitividade e precisão intermediária inferior a 20%. Os limites de detecção foram de 132, 139 e 143 ng/mL, e os limites de quantificação foram de 399, 423 e 433 ng/mL de ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin, respectivamente. O método foi seletivo e aplicado na determinação de ciprofloxacina em amostras de água tratada. Por meio dos resultados obtidos, foi possível concluir que o método proposto é seguro, barato, simples, rápido e de fácil manuseio.

ABSTRACT

MORAES, Luiza Dumont de Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Method for determination of fluoroquinolones in waters using silver nanoparticles.** Adviser: Renata Pereira Lopes Moreira. Co-advisers: André Fernando de Oliveira and Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira.

Fluoroquinolones claim to be one of the most prescribed classes of antibiotics because of their broad spectrum antibacterial activity, combating various infections in both humans and animals. However, its indiscriminate use and due to its action against various types of bacteria can generate bacterial resistance in a more generalized way. Moreover, they can be absorbed in animal tissues and excreted in certain proportions, in their non-metabolised forms, which can cause contamination in the intake of meat and also environmental foods. It is reported in the literature the contamination of effluents and even in treated water with this antibiotics. Therefore, in this work, is proposed a method for the determination of fluoroquinolones from the use of silver nanoparticles (AgNPs) stabilized with glutathione (GSH) as colorimetric nanosensors for ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENRO) and norfloxacin (NOR) in aqueous systems. AgNPs were stabilized with GSH (AgNPs-GSH) and characterized by Dinamic light scattering (DLS) and Molecular absorption spectrophotometry (MAS-UV / Vis), and had been performed assays monitoring the decrease of the localized surface plasmon resonance band (RPLS) at 400 nm while the redshift absorption band was formed. The method was validated and the linear working range was determined between $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ for ENRO and NOR, and de $6,94 \times 10^{-6}$ a $3,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ for CIP. The analytical performance of the method was validated, and the results were satisfactory, with recoveries between 83.7 and 110% (except the CIP on the third day that obtained 73.8%) and the repeatability and intermediate accuracy of less than 20%. The limits of detection were 132, 139 e 143 ng/mL , and the limits of quantification were 399, 423 e 433 ng mL⁻¹ for ciprofloxacin, norfloxacin and enrofloxacin, respectively. The method was selective and applied in the determination of ciprofloxacin in treated water samples. Through the results obtained, it was possible to conclude that the proposed method is safe, cheap, simple, fast and easy to handle.

CAPÍTULO 1:
Introdução, Revisão da Literatura
e Objetivos

1.1. Introdução

Água tratada é um dos recursos naturais mais importantes por ser responsável pela manutenção da vida e da saúde dos organismos vivos em geral. Nos dias atuais, entretanto, tem causado preocupação de diferentes órgãos ambientais pela constante poluição que vem sofrendo. Dentre os poluentes e contaminantes presentes nos recursos hídricos, destacam-se os Contaminantes Emergentes (CE). Os CE são recalcitrantes e de alta toxicidade e periculosidade ecológica. Muitos são de origem antropogênica, e que não são comumente monitorados e nem facilmente removidos pelos sistemas convencionais de tratamento das ETES. Os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs, do inglês PPCPs - pharmaceuticals and personal care products) são os mais preocupantes pela comunidade científica e pelo público desde 2000, por serem distribuídos no meio ambiente e, principalmente, por circularem pela fase aquosa (HE et al., 2016).

Os antibióticos representam uma grande classe desses produtos farmacêuticos. Correspondem à terceira classe de medicamentos mais usados pelos seres humanos, correspondendo a 6%, e mais de 70% para uso veterinário (HE et al., 2016). Os antibióticos são usados para combater infecções, mas em uso veterinário também servem para acelerar a taxa de crescimento animal, principalmente em pecuária e aquicultura (ADACHI et al., 2013; HE et al., 2016; RIAZ et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014)

A resistência bacteriana gerada pelo uso extensivo de antibióticos é uma questão muito importante porque ameaça à saúde humana e a do nosso planeta (HE et al., 2016; YIN et al., 2017). Ultimamente, tem acontecido muitos casos de mortes de pessoas e animais por infecções causadas por superbactérias. Superbactérias geram infecções que um indivíduo não consegue combater sozinho, nem com o uso de antibióticos disponíveis.

Os antibióticos da família das fluoroquinolonas (FQs) são muito utilizados pelo seu amplo espectro de ação e elevado uso clínico (YIN et al., 2017). Eles têm sido encontrados em águas superficiais, lençóis freáticos, águas residuais, esgotos, e inclusive em muitos países, em água tratada residencial (ADACHI et al., 2013; HEBERER, 2002; VAN DOORSLAER et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Existem alguns métodos analíticos reportados na literatura, para determinação de FQs e derivados, como a Eletroforese Capilar, Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis, e variados tipos

de métodos cromatográficos (AMJADI; FARZAMPOUR, 2014; CASTRIGNANÒ, ERIKA; KANNAN ANDREW M; FEIL, 2018; DERAYEA et al., 2017; GUO et al., 2016; KAMAGATE et al., 2018; SPELTINI et al., 2010; YIN et al., 2017; ZHANG et al., 2015). Esses métodos são eficazes, porém demandam elevado tempo de análise, ou são instrumentos sofisticados e complicados de se manipular, ou possuem sensibilidade e seletividade limitadas para detecção de pequenas quantidades de FQs em soluções aquosas (YIN et al., 2017).

Uma alternativa para determinação de FQs em água consiste no emprego de um método colorimétrico empregando suspensão de nanopartículas de prata (NPsAg). Afinal, as NPsAg de prata têm sido amplamente utilizadas, com diferentes aplicações na química, como, por exemplo, detecção de diferentes tipos de analitos e como catalisadores em reações (DANIEL; ASTRUC, 2004; KRUTYAKOV et al., 2008; LALIWALA et al., 2014; LI et al., 2010; LI; CUI; HAN, 2009; NETTO-FERREIRA, 2015; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012; WANG et al., 2012a, 2018a; XIONG; LI, 2008; ZHANG; WANG, 2014; ZHANG et al., 2018). Aplicações em outras áreas também são relatadas, com ação bactericida e aplicações biomédicas, etc (DANIEL; ASTRUC, 2004; KRUTYAKOV et al., 2008; NETTO-FERREIRA, 2015; WANG et al., 2018a; ZHANG; WANG, 2014). A vantagem dos métodos colorimétricos é que eles são simples, rápidos e dispensam o uso de equipamentos sofisticados e complexos.

1.2. Revisão da literatura

1.2.1. Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs) no meio ambiente

Os compostos classificados como produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs) consistem em cosméticos e medicamentos em geral, sendo controlados ou não, nutracêuticos, detergentes, perfumes, repelentes e esteroides, ou ainda usados no agronegócio para aprimorar o crescimento ou a saúde do rebanho. A produção e consumo de PFCPs estão em contínuo avanço à medida que doenças surgem e se desenvolvem novos medicamentos, e também devido à demanda de qualidade de vida e conforto.

No mundo, são cerca de 5000 compostos farmacêuticos diferentes para uso humano e veterinário. Os fármacos são um amplo grupo de compostos divididos em classes, como por exemplo, analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antiepilépticos,

hormônios, antidepressivos, desinfetantes e antissépticos, entre outros (VAN DOORSLAER et al., 2014).

Em 2016, uma pesquisa verificou que um indivíduo brasileiro consumiu, em média por ano, 700 doses de remédios comprados em farmácias, representando um aumento de 42% de consumo de medicamentos em cinco anos (MAGALHÃES; WERNECK, [s.d.]). O Brasil está entre os 10 maiores mercados farmacêuticos do mundo. Com efeito, a produção e o consumo de medicamentos estão diretamente relacionados à quantidade que é lançada no meio ambiente.

Mais de 100 compostos foram detectados na rede de tratamento de águas residuais da União Europeia (ADACHI et al., 2013). A ocorrência desses compostos no meio ambiente está relacionada à rede de tratamento de águas residuais, lixiviação de aterros sanitários, resíduos industriais, e por excreção animal, devido ao uso de drogas e aditivos alimentares (ADACHI et al., 2013; HEBERER, 2002). Cerca de 500 fármacos, incluindo desinfetantes, pesticidas e antibióticos, foram usados para prevenir e tratar doenças em aquiculturas na China (HE et al., 2016). Quase um milhão de quilogramas de oxitetraciclina e sete milhões de quilogramas de clorotetraciclina foram utilizados para alimentação animal por ano (HE et al., 2016).

Estudos feitos em 12 países, incluindo o Brasil, encontraram mais de 80 compostos farmacêuticos e inúmeros metabólitos acima do nível de $\mu\text{g L}^{-1}$, em esgotos, águas de superfície e lençóis freáticos (HEBERER, 2002). Sobretudo, muitas vezes esses dejetos não são eliminados adequadamente em redes de tratamento, mas descartados como contaminantes diretamente no meio ambiente (HEBERER, 2002). Desses produtos lançados no meio ambiente, entre os mais perigosos são os medicamentos da classe dos antibióticos.

1.2.2. Antibióticos

Antibióticos são substâncias naturais, sintéticas ou semi-sintéticas que possuem capacidade de inibir o crescimento ou matar bactérias. Os antibióticos podem ser divididos em classes e dentro de cada classe, em gerações. As classes mais utilizadas são os β -lactâmicos, as sulfonamidas, os furanos, as tetraciclina, os macrolídeos e as quinolonas (HE et al., 2016). As gerações representam a ineficiência dos antibióticos frente às bactérias que anteriormente eram combatidas por eles. Ou seja, quando as bactérias sofrem alterações genéticas e adquirem resistência àquele antibiótico, este

possui sua estrutura parcialmente alterada, tornando-se um derivado daquele antibiótico, isto é, uma geração posterior ao antibiótico de partida.

O excessivo uso de agentes bactericidas pode aumentar a ocorrência de resistência bacteriana em casos clínicos e no meio ambiente. Bactérias submetidas por longo tempo, mesmo a doses subterapêuticas de antibióticos, podem sofrer pressão seletiva - alterações genéticas - e mudar a sensibilidade que possuía do agente microbiano no meio ambiente (ADACHI et al., 2013; HE et al., 2016). Um exemplo disso é o caso da *Escherichia coli* que possui inibição de crescimento suscetível a 1-10 µg L⁻¹ de fluoroquinolonas. Se essas concentrações estiverem presentes no meio ambiente, então existe uma chance de pressão seletiva proporcional à concentração do fármaco, e por fim suscitar a resistência bacteriana (CASTRIGNANÒ, ERIKA; KANNAN ANDREW M; FEIL, 2018).

1.2.2.1. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas pertencem à família das quinolonas e foram um dos primeiros antibióticos a serem produzidos de forma totalmente sintética (REVEST; TATTEVIN, 2014). A primeira quinolona a ser descoberta foi o ácido nalidíxico (Figura 1), descoberto em 1962, em pesquisas contra malária, e é considerada de primeira geração possuindo um espectro de ação muito estreito (LLOR VILÀ; MAYER PUJADAS; COTS YAGO, 2000; REVEST; TATTEVIN, 2014; RIAZ et al., 2018; SAYIN et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014).

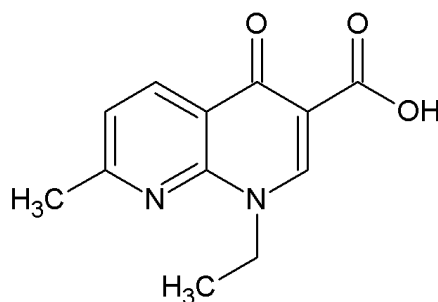


Figura 1. Estrutura química do ácido nalidíxico (ácido 1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridino-3-carboxílico).

Ao final da década de 80, surgiram as primeiras fluoroquinolonas, que possuíam um espectro mais amplo, curando além das infecções urinárias, também as respiratórias, gastrointestinais, genitais, ósseas, articulares e sistêmicas (LLOR VILÀ; MAYER PUJADAS; COTS YAGO, 2000). A flumequina (ver estrutura no *Quadro 1*, página 7)

foi a primeira quinolona monofluorada, da qual gerou o subgrupo das fluoroquinolonas (RIAZ et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014). Não há um consenso ou regra explícita na literatura de como são classificadas as gerações das quinolonas, pois cada autor classifica de uma forma. Muitos classificam cronologicamente ou de acordo com a ineficiência da droga. Outros classificam conforme o espectro de ação e doenças e outros classificam conforme as semelhanças estruturais. Entretanto, uma divisão bem aceita é a separação entre as quinolonas e as fluoroquinolonas, as quais diferem na presença do flúor na sua composição (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

Em geral, as FQs possuem facilidade de uso por serem preferencialmente prescritas para via oral, boa tolerabilidade, boa biodisponibilidade, difusão celular e amplo espectro. Por essas razões, são mais prescritas que outros antibióticos (REVEST; TATTEVIN, 2014). São geralmente classificadas em diferentes gerações baseadas no seu espectro bactericida, sendo que as gerações mais recentes possuem espectros mais amplos. Para as FQs utilizadas em humanos, o número de gerações varia desde a primeira. Autores estadunidenses costumam relatar um total de quatro gerações, enquanto autores europeus relatam apenas três gerações (VAN DOORSLAER et al., 2014).

Tabela 1. Espectro simplificado de atividade das fluoroquinolonas em ausência de resistências adquiridas (REVEST; TATTEVIN, 2014)

Bacilos gram-negativos	Enterobacterias (<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>) <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i> e <i>Vibrio spp.</i> <i>Haemophilus influenza</i>
Cocos gram-negativos	<i>Neisseria meningitidis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Branhamella catarrhalis</i>
Cocos gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>
Germes intracelulares	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Chlamydomphila spp.</i> <i>Mycoplasma spp.</i>

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste na inibição da enzima DNA-girase, que é responsável pela organização do cromossoma microbiano, mantendo a estrutura helicoidal do DNA. Essa enzima também é responsável pela síntese, reparação e recombinação do RNA bacteriano (LLOR VILÀ; MAYER PUJADAS; COTS YAGO,

2000). As FQs também atuam na enzima topoisomerase IV como segundo alvo (ADACHI et al., 2013). Por causa dessas atividades, as FQ são danosas aos organismos vivos. Além disso, as fluoroquinolonas são conhecidas também como agentes quimioterápicos (SAYIN et al., 2018).

Para uso humano, a fluoroquinolona mais comercializada é a ciprofloxacina, por ser a mais ativa até o momento, sendo capaz de inibir cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a concentrações inferiores a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LLOR VILÀ; MAYER PUJADAS; COTS YAGO, 2000). As fluoroquinolonas mais conhecidas são a ciprofloxacina, a norfloxacina e a enrofloxacin (GUO et al., 2016; HE et al., 2016), sendo a enrofloxacin para uso exclusivo veterinário, e as demais preferencialmente para humanos, mas também com aplicação animal (HE et al., 2016; VAN DOORSLAER et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

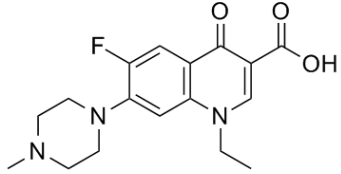
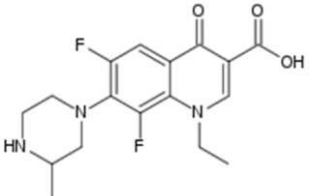
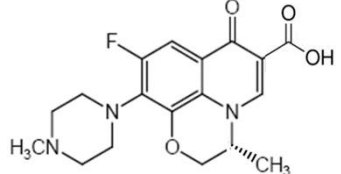
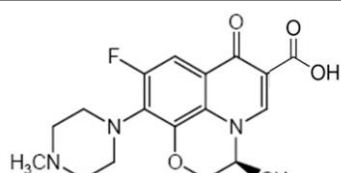
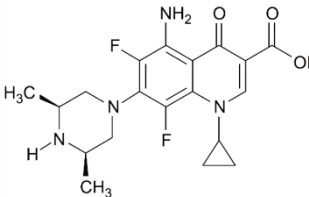
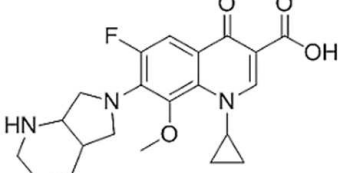
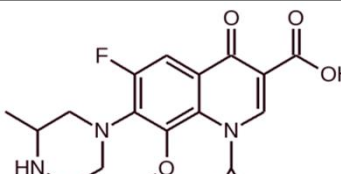
Por serem as mais comuns, as FQs são encontradas em diversos compartimentos do meio ambiente, principalmente, sistemas aquosos, como em águas superficiais, lençóis freáticos, águas residuais, esgotos, e inclusive em muitos países, em água tratada residencial (ADACHI et al., 2013; HEBERER, 2002; RIAZ et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Apesar do baixo potencial de adsorção das fluoroquinolonas, elas possuem boa afinidade por lodos, solos e sedimentos (RIAZ et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014).

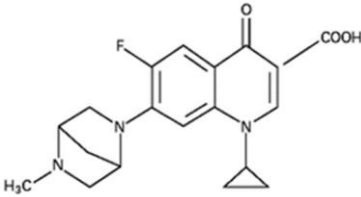
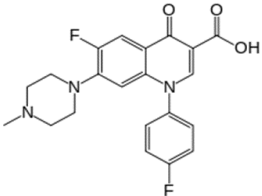
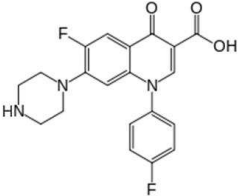
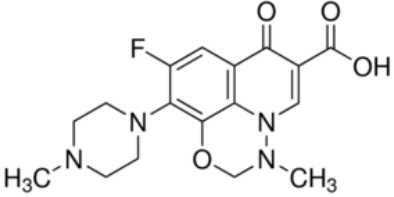
No Quadro 1. Estruturas, gerações, massa molar, uso e características das FQs detectadas no meio ambiente (VAN DOORSLAER et al., 2014). Quadro 1, são mostradas algumas características de algumas fluoroquinolonas comumente encontradas no meio ambiente.

Quadro 1. Estruturas, gerações, massa molar, uso e características das FQs detectadas no meio ambiente (VAN DOORSLAER et al., 2014).

Geração	MM (g mol^{-1})	Uso	Composição	Abreviação	Estrutura
1	261,30	Vet.	Flumequina	FLU	

Capítulo 1. Introdução, revisão da literatura e objetivos

2	333,36	Hum.	Pefloxacina	PEFL	
2	351,35	Hum.	Lomefloxacin	LOME	
2	361,37	Hum..	Ofloxacin	OFL	
2	361,37	Hum..	Levofloxacin	LEVO	
2	392,41	Hum..	Esparfloxacin	ESPAR	
3	401,43	Hum..	Moxifloxacin	MOX	
3	375,39	Hum..	Gatifloxacin	GATI	

***	357,37	Vet..	Danofloxacin	DANO	
***	399,39	Vet..	Difloxacin	DI	
***	385,36	Vet..	Sarafloxacin	SARA	
***	362,36	Vet..	Marbofloxacin	MARBO	

*conforme a classificação de gerações do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC). ** não pertence a nenhuma classificação. Adaptado de (ADRIAENSSENS et al., 2011 *apud* VAN DOORSLAER et al., 2014).

1.2.2.2. Contaminação no meio ambiente por fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas no ambiente sofrem um processo de migração entre os compartimentos da natureza, assim como qualquer outra substância. Essas FQs podem poluir as águas subterrâneas, águas superficiais e água tratada por meio de lixiviação, filtração e outros caminhos de migração e entrar na cadeia alimentar pela absorção e acúmulo nas lavouras, prejudicando a saúde humana e dos animais (GUO et al., 2016; HE et al., 2016; VAN DOORSLAER et al., 2014). As fontes de contaminação de fluoroquinolonas mais comuns são hospitais, casas urbanas, indústrias, fazendas de criação de animais e aquicultura (HE et al., 2016; RIAZ et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014). Sendo os hospitais, as casas urbanas e as indústrias, as principais fontes para contaminação antropogênica de FQs no ambiente (RIAZ et al., 2018).

Quando as FQs são administradas em humanos, estas são metabolizadas parcialmente, com excreção entre 30 a 70% da fórmula original do medicamento, isto é,

sem a formação de subprodutos (REVEST; TATTEVIN, 2014; VAN DOORSLAER et al., 2014). Outro ponto importante, que pode explicar uma detecção baixa de enrofloxacin em locais onde é empregado, é o fato deste ser metabolizado completamente em ciprofloxacina (Andreu *et al.*, 2007 *apud* Van Doorslaer *et al.*, 2014). Sabendo que o fármaco é mais nocivo que seu subproduto, e que os organismos vivos expõem para o meio ambiente, em grande parte, o fármaco na sua fórmula original, e da séria questão da resistência bacteriana, é importante conhecer as fontes de contaminação para detecção do fármaco, e então, possibilitar a sua remediação no meio ambiente.

1.2.2.2.1. Fontes de aplicação humana

Lin *et al.* 2009, Sim *et al.* 2011 e Watkinson *et al.* 2009 estudaram a presença de FQs nas bacias hidrográficas de Taipei (Taiwan), da Coreia do Sul e do sudeste de Queensland (Austrália), respectivamente. Os estudos foram realizados em redes de tratamento de água em que não houvesse hospitais, fábricas de produtos farmacêuticos, e fontes rurais de contaminação próximas. As fontes consideradas urbanas foram referentes apenas às casas residenciais. Foram encontrados nesses locais concentrações que variavam de 2 ng L⁻¹ a 14 µg L⁻¹, com apenas 16% das amostras (n = 410) excedendo a 1 µg L⁻¹ (VAN DOORSLAER et al., 2014). Na Europa, foram encontradas de 190 a 326 g/dia de contaminação por FQs provenientes de casas residenciais (RIAZ et al., 2018).

Golet *et al.* (2001) (*apud* He *et al.* 2016) analisaram FQs em efluentes na Suíça e encontraram concentrações de ciprofloxacina e norfloxacina em contração de 249 a 405 ng L⁻¹ e de 45 a 120 ng L⁻¹, respectivamente. Também foram identificadas pelos autores altas concentrações de FQs em efluentes hospitalares.

Em hospitais na China, Noruega e Suíça, foram encontradas 0,3 a 29 g/dia em fluxo de fluoroquinolonas em efluentes (RIAZ et al., 2018). De acordo com Van Doorslaer *et al.*, de 148 hospitais na China, foram encontradas concentrações entre 3 ng L⁻¹ e 240 µg L⁻¹, com mais de 60% do conjunto de dados excedendo 1 µg L⁻¹. As fluoroquinolonas mais detectadas foram ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina (VAN DOORSLAER et al., 2014). No caso de hospitais, apenas as FQs de uso humano é que são detectadas.

Da literatura revisada por Van Doorslaer *et al.*, as concentrações de FQs de efluentes próximos a indústrias farmacêuticas na Croácia, Holanda e Taiwan variaram de 6 ng L⁻¹ até 31 mg L⁻¹ (BABÍĆ *et al.*, 2010; LIN; YU; LIN, 2008; SIM *et al.*, 2011; WALRAVEN; LAANE, 2009). A média das concentrações de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina nas águas residuais dessas fábricas foram de 103 µg L⁻¹, 270 µg L⁻¹ e 4,9 mg L⁻¹, respectivamente. No Paquistão, foram reportadas três espécies de fluoroquinolonas detectadas em concentrações em torno de 40 a 60 µg L⁻¹. Na Índia, um total de 46 kg/dia contendo ciprofloxacina, norfloxacina, lomofloxacina e ofloxacina lançados em efluentes próximos a 90 indústrias (RIAZ *et al.*, 2018).

1.2.2.2.2. Fontes de aplicação veterinária

Os despojos que são gerados da criação animal e pecuária são compostos por águas residuais e excremento dos animais. Segundo a revisão feita por Van Doorslaer *et al.*, foram encontrados em águas residuais de animais, concentrações de 63 ng L⁻¹ a 585 ng L⁻¹ de enrofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina (SIM *et al.*, 2011). Em estrume de animais foram encontrados um faixa de 5,3 µg kg⁻¹ até 1,4 g kg⁻¹ de FQs. Em oito províncias da China foram encontradas, em excrementos de frango, porco, e vacas concentrações entre 1 e 5 mg kg⁻¹ de FQs (ZHAO; DONG; WANG, 2010). A enrofloxacina é mais especificamente administrada em frangos e perus, e foram encontradas concentrações máximas de 2,8 e 8,3 mg kg⁻¹ nas amostras de tecidos dessas aves. No Brasil, foram encontrados enrofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina em frangos nas concentrações de 6,7 mg kg⁻¹, 1,4 mg kg⁻¹ e 2,6 mg kg⁻¹, respectivamente (MARTÍNEZ-CARBALLO *et al.*, 2007).

Além da criação de animais terrestres, existem também as aquiculturas, que consistem na criação de peixes, caranguejos, camarões, mexilhões etc. Samueisen *et al* (*apud* He *et al*) reportaram que apenas 20-30% dos antibióticos usados na aquicultura foram absorvidos por peixes e 70-80% ficaram dispersos na água. Nie *et al* (*apud* He *et al*) realizaram um estudo sobre a poluição no delta do Pearl River (China) e detectaram concentrações de norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina em sedimentos de piscicultura na água doce de 5,03 a 13,28 ng g⁻¹, 3,64 a 9,32 ng g⁻¹ e 0 a 7,13 ng g⁻¹, respectivamente. Em água marítima, esses autores encontraram de 1,88 a 8,81 ng g⁻¹ de norfloxacina e 0 a 1,09 ng g⁻¹ de ciprofloxacina. Ainda nesse estudo, os autores encontraram concentrações de norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina em músculos

e fígado de peixes de 1,95 a 100,54 ng g⁻¹, 0,48 a 33,26 ng g⁻¹ e 1,18 a 51,89 ng g⁻¹, respectivamente.

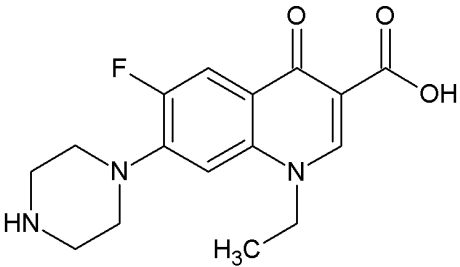
1.2.3. Informações técnicas

Neste trabalho serão estudadas três fluoroquinolonas, a norfloxacin, a ciprofloxacina e a enrofloxacin. Abaixo serão apresentadas algumas informações técnicas e curiosidades a respeito desses fármacos.

1.2.3.1. Norfloxacin (NOR)

O ácido 1-etil-6-fluor-1,4-dihidro-7-(1-piperazinil)-4-oxoquinolona-3-carboxílico, conhecida comercialmente como norfloxacin (Quadro 2), foi a primeira fluoroquinolona desenvolvida, no ano de 1978. Por isso alguns autores ainda a classificam como primeira geração, mas a grande maioria a classifica como segunda geração, devido à sua semelhança estrutural com a ciprofloxacina.

Quadro 2. Propriedades físico-químicas da norfloxacin (NOR)

Estrutura química	Propriedades físico-químicas
	<ul style="list-style-type: none">-Fórmula empírica: C₁₆H₁₈FN₃O₃.-Massa molar: 319,34 g mol⁻¹-Aparência: sólido de cor amarelo pálido-Solubilidade: A NOR é altamente solúvel em ácido acético e ácido clorídrico e ligeiramente solúvel em etanol, metanol e água (assim como a enrofloxacin e a ciprofloxacina).

Esse composto possui maior meia-vida, menos ligação às proteínas e melhor atividade contra bactérias gram-negativas que seus predecessores, tendo uma difusão sistêmica limitada e, portanto, uma excelente concentração urinária sendo preferencialmente prescrita para casos de cistites (BALL, 2006; CUPRYS et al., 2018; REVEST; TATTEVIN, 2014)

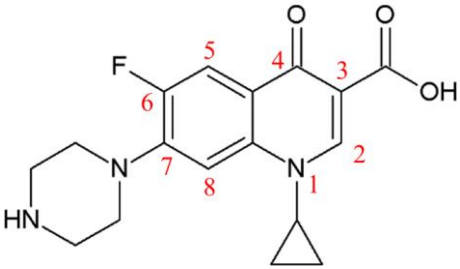
1.2.3.2. Ciprofloxacina (CIP)

O ácido 1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-7-(piperazinil)-4-oxoquinolona-3-carboxílico (Quadro 3) é conhecido como ciprofloxacina. Comercialmente, é uma das

mais potentes fluoroquinolonas atualmente disponíveis contra bactérias gram-negativas. Tem boa biodisponibilidade, de aproximadamente 70%, sendo muito eficiente no tratamento de infecções do trato urinário (ITU), prostatites, gastroenterites, (Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), entre outras (BALL, 2006; CUPRYS et al., 2018; LLOR VILÀ; MAYER PUJADAS; COTS YAGO, 2000; REVEST; TATTEVIN, 2014).

A CIP é a fluoroquinolona mais prescrita e usada como composto referência da família das fluoroquinolonas (ADRIAENSSENS et al., 2011). Sua estrutura molecular se assemelha a da norfloxacin com a diferença de possuir um grupo ciclopropil ligado ao nitrogênio da posição 1 (CUPRYS et al., 2018).

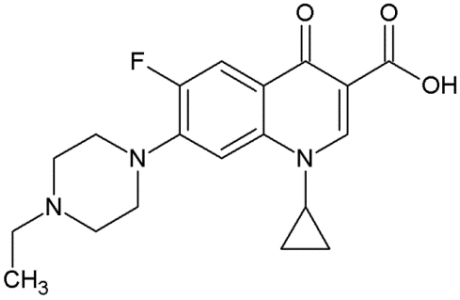
Quadro 3. Propriedades físico-químicas da ciprofloxacina (CIP)

Estrutura química	Propriedades físico-químicas
	<p>-Fórmula empírica: C₁₇H₁₈FN₃O₃ ou na forma de cloridrato: C₁₇H₁₈FN₃O₃HCl•H₂O</p> <p>-Massa molar: 331,34 g mol⁻¹</p> <p>-Aparência: sólido de cor amarelo-pálido a branco</p> <p>-Solubilidade: Semelhante à da NOR (Quadro 2)</p>

1.2.3.3. Enrofloxacin (ENRO)

A enrofloxacin (Quadro 4) ou ácido 1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-7-(4-etil-1-piperazinil)-4-oxoquinolona-3-carboxílico é uma fluoroquinolona de uso exclusivo em medicina veterinária que possui excelente atividade contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas (CUPRYS et al., 2018). Cada espécie animal apresenta um metabolismo diferente, ocorrendo muitas vezes biotransformação e eliminação na forma de ciprofloxacina (CUPRYS et al., 2018; VAN DOORSLAER et al., 2014).

Quadro 4. Propriedades físico-químicas da enrofloxacin (ENRO)

Estrutura química	Propriedades físico-químicas
	<p>Fórmula empírica: C₁₉H₂₂FN₃O₃</p> <p>Massa molar: 359,39 g mol⁻¹</p> <p>Aparência: sólido de cor branca</p> <p>Solubilidade: Semelhante à da NOR e CIP (Quadro 2 e 3)</p>

Diante de tudo que foi mencionado sobre as FQs, apresentando dados de contaminação do meio ambiente, especialmente em fase aquosa, percebe-se a importância de detectar e quantificar esses contaminantes para realizar o tratamento das águas. Nesse sentido, as nanopartículas metálicas vêm atraindo a atenção de pesquisadores nos últimos anos, que as utilizam como nanosensores de diferentes compostos como será relatado no próximo item.

1.2.3. Nanopartículas metálicas

A nanociência tem se desenvolvido consideravelmente nos últimos anos e, com isso, muito tem se investido em pesquisas de novos nanomateriais mais estáveis, resistentes e que possam ser utilizados em diferentes aplicações. As nanopartículas metálicas (NPs), por exemplo, são conhecidas desde a antiguidade. Hoje em dia tem sido utilizadas amplamente em aplicações biomédicas, magnéticas, eletrônicas, catalíticas, analíticas, absorptivas, ambiental, alimentícia, etc (ARAGAY; PINO; MERKOÇI, 2012; ASSIS et al., 2012; BARRATT, 2000; CARREÑO et al., 2002; SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011). A versatilidade das NPs metálicas é devido às suas características e propriedades na escala nano, que são diferentes de quando estão na sua forma macro (“bulk”). Por exemplo, as NPs possuem maiores áreas superficiais específicas, propriedades ópticas específicas, pontos de fusão mais baixos, resistências mecânicas e magnetizações.

Apesar do desenvolvimento tecnológico, existem ainda grandes desafios a serem superados. Um desses desafios é fazer com que as nanopartículas metálicas sejam capazes de se manter estáveis por longos períodos de tempo, sem que haja perda de suas propriedades, ou modificações estruturais, já que as NPs são termodinamicamente instáveis e tem a tendência natural de se agregar. Dessa maneira, existe uma intensa busca

por novos métodos de síntese e funcionalização dessas NPs, a fim de aumentar a sua estabilidade química.

Existem dois métodos de síntese de nanopartículas: o método *Top-down* – de “cima para baixo”; e o *Bottom-up* – de “baixo para cima”. O primeiro refere-se a técnicas que começam a partir do macro para o nano, enquanto o segundo começa a partir de átomos e íons ou moléculas para o nano. No esquema a seguir, são apresentadas algumas metodologias mais comuns para síntese de nanopartículas.

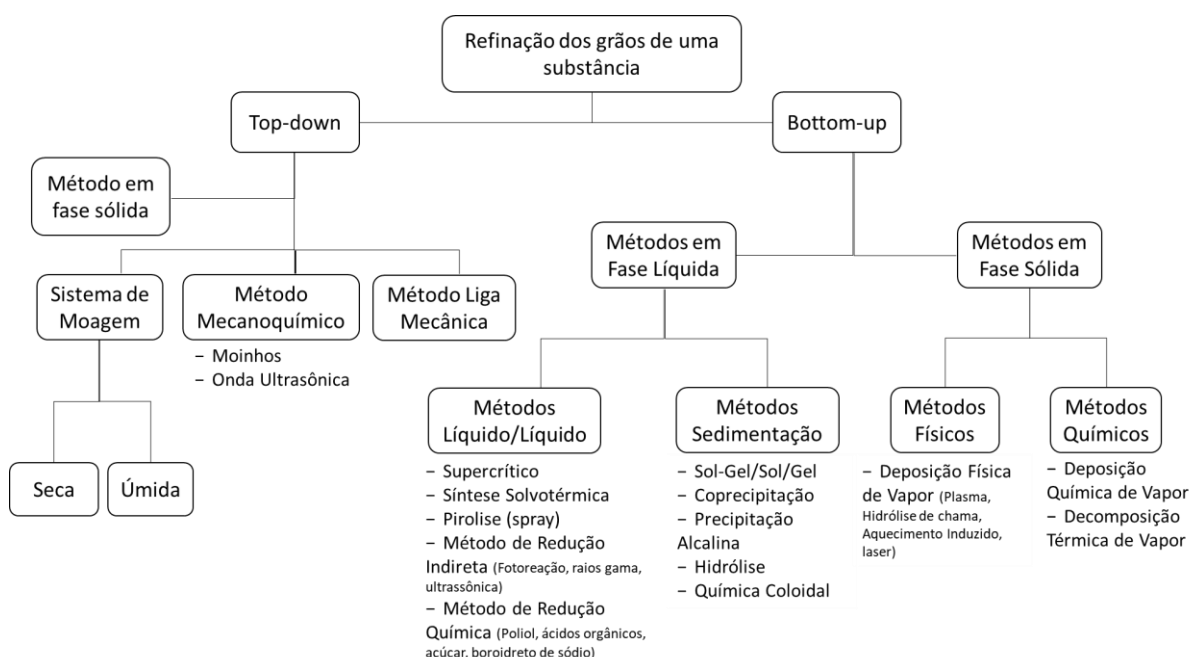


Figura 2. Esquema dos tipos de sínteses de nanomateriais (Adaptado de HORIKOSHI; SERPONE, 2016)

O método *Bottom-up* é mais utilizado e apresenta processos de nucleação e crescimento das NPs que governam o tamanho e a morfologia delas. Entretanto, algumas dificuldades surgem no processo como controlar o tamanho das partículas, cessar o crescimento delas por agregação e purificar o material final, por causa de produtos da reação indesejáveis que ficam presentes após a síntese.

O que define uma técnica mais apropriada para síntese do que a outra é aquela que apresenta algumas condições como maior reprodutibilidade, boa capacidade de controle de tamanho, distribuição de tamanhos, distribuição da composição química, forma desejada, entre outros. Outros parâmetros também são importantes, como menor

quantidade de subprodutos reacionais gerados, alta pureza das NPs, controle da cinética de agregação, estabilização.

1.2.3.4. Ressonância plasmônica localizada de superfície (RPLS)

As nanopartículas metálicas (NPs) apresentam muitas propriedades anisotrópicas interessantes. Um exemplo de uma propriedade ótica anisotrópica é a ressonância plasmônica de superfície, que consiste na oscilação de plasma. O conceito de plasma foi primeiramente descrito por Langmuir (1928) e é definido como sendo um grande número de íons positivos e elétrons livres, totalizando uma carga nula.

A oscilação de plasma ocorre em alguns materiais metálicos devido ao fato de que os metais possuem elétrons na banda de condução e que, portanto, são praticamente livres para se moverem na superfície do material formando, assim, um sistema de íons positivos formadores da rede cristalina. Na superfície do material ocorre uma ressonância desses elétrons condutores quando uma radiação eletromagnética adequada atinge essa superfície. O plasmon é definido como sendo o quantum correspondente à oscilação de plasma.

Quando as dimensões de um condutor são reduzidas, como o caso das nanopartículas - partículas de dimensões menores que o comprimento de onda da luz, efeitos de superfície são muito importantes. Por essa razão, propriedades óticas de NPs metálicas são dominadas pela ressonância plasmônica com a radiação eletromagnética incidente e o fenômeno é, então, chamado de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPLS). Por outro lado, a ressonância plasmônica também pode ocorrer com filmes e fios, em que a propagação no meio é planar/linear, e possuem dimensões maiores que o comprimento de onda da luz. Neste caso, o fenômeno é chamado de ressonância plasmônica de superfície de poláritons (BENSON, 2011; GARCIA, 2011a; GERBER et al., 2017; JACKSON; MOAKES, 2000; MARZA; M, 2006). Ambos constituem fenômenos de superfície plasmônica (SP) nos quais a luz propaga-se na interface entre o metal e o meio dielétrico.

O estudo sobre SP começou em 1908, quando um físico alemão chamado Gustav Mie, publicou seu trabalho pioneiro explicando as propriedades óticas de colóides metálicos. Ele propôs algumas condições de contorno para as equações de Maxwell para absorção e dispersão da radiação eletromagnética por esferas de pequenas dimensões, ou seja, estabeleceu relações entre a absorvidade dessas partículas e suas condições físico-

químicas (MARTINS; TRINDADE, 2012). A teoria de Mie apresenta um modelo no qual é necessário considerar que as partículas sejam esféricas de tamanho uniforme, circundadas por um meio dielétrico real e em concentrações diluídas (as distâncias entre as partículas sejam grandes) (GARCIA, 2011a; MARZA; M, 2006). Outros modelos, entretanto, já consideram estruturas mais complexas (nano bastões, primas, etc), dispersões coloidais mais concentradas, partículas de tamanhos maiores que os comprimentos de onda da luz, etc. (MARZA; hoener). Esses modelos são descritos por equações matemáticas complexas, que fogem o escopo deste trabalho. Entretanto, é possível compreender o efeito de RPLS por meio de figuras esquemáticas, e porque determinados eventos influenciam esse fenômeno nas nanopartículas. Para isso, consideremos que as nanopartículas sejam esféricas.

Uma nanopartícula metálica pode ser descrita como uma rede de núcleos iônicos, com elétrons de condução movendo-se quase livremente dentro da NP (gases de elétrons), como mostrado na Figura 3. Quando a partícula é iluminada, o campo elétrico da luz exerce uma força sobre esses elétrons de condução, movendo-os em direção à superfície da NP. Como esses elétrons estão confinados dentro da NP, é gerado um dipolo elétrico na partícula esférica. Esse dipolo gera um campo elétrico oposto dentro da NP ao da luz incidida, criando uma força restauradora, que forçará os elétrons a retornarem à posição de equilíbrio (Figura 3)¹. Quanto maior o deslocamento de elétrons, maior o dipolo elétrico e, conseqüentemente, maior a força restauradora. Acontece que os elétrons passam a oscilar em uma determinada frequência (e isso depende da força restauradora e características da nanopartícula que determinam a amplitude e a fase) de forma coerente com a luz incidida.

¹ Na figura 3, as esferas escuras representam os núcleos atômicos do metal, e os elétrons são representados pelas esferas menores que se deslocam para cima, formando o dipolo na NP esférica que por sua vez é representada pela esfera grande cinza.

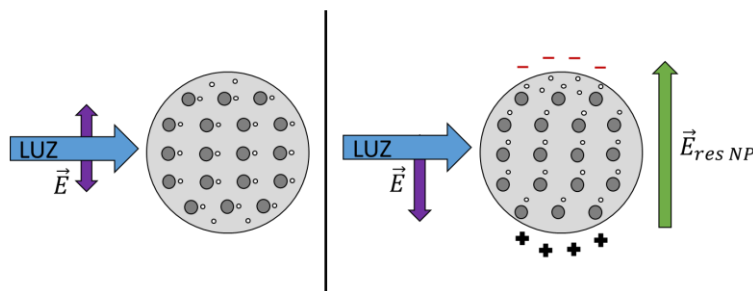


Figura 3. Esquema da interação de luz com uma NP metálica (Adaptado de GARCIA, 2011).

A amplitude da oscilação será máxima para essa frequência (frequência ressonante), chamada frequência plasmônica. A ressonância plasmônica ocorre quando a amplitude aumenta devido à superposição construtiva entre a radiação eletromagnética e a oscilação dos elétrons na superfície da NP, que pode ser visualizada no espectro (Figura 4). A oscilação dos elétrons implica num aumento da energia cinética deles e, assim, um aumento na energia eletrostática do dipolo proveniente da luz incidente, que pela conservação da energia, extingue parcialmente a luz (parcialmente, porque os elétrons sofrem amortecimentos e nem sempre são excitados pela luz). Quanto maior a excitação dos elétrons, maior a extinção da luz. Dessa forma é possível observar a excitação de plasmons em um espectro de absorção como será mostrado na página 22 (Figura 4) (GARCIA, 2011a; HOENER et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

A extinção da luz ocorre por absorção e espalhamento dela. A capacidade de extinção da luz é medida pelo coeficiente de extinção (absortividade) e representa a eficiência com que uma partícula remove fótons de um feixe incidente. Quando um feixe incide perpendicularmente numa NP, esta absorve esses fótons através dos elétrons que se tornam excitados numa área que corresponde a seção transversal de absorção, que é a seção transversal geométrica da partícula opaca. Entretanto partículas reais, também ocorrem processos de espalhamento, em que os fótons são espalhados ao atingirem uma seção transversal quântica, sem de fato atingir a seção geométrica da partícula. Essas duas áreas combinadas descrevem o processo de extinção da luz numa nanopartícula, sendo a área de incidência da luz chamada de seção transversal de extinção.

A seção transversal de extinção é maior que a seção geométrica da partícula opaca, por isso algumas nanopartículas metálicas são capazes de absorver e principalmente espalhar fótons tão eficientemente e possuem altos coeficientes de absortividade. Por isso NPs metálicas podem ser usadas, como nanosensores colorimétricos.

O fenômeno de ressonância plasmônica é muito influenciável por pequenas variações no ambiente (BALAVANDY et al., 2014; IRANIFAM, 2016; JACKSON; MOAKES, 2000; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; NETTO-FERREIRA, 2015; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012) e, por isso, existem diferentes modelos para descrever o comportamento ótico das nanopartículas. Alguns efeitos que influenciam na Ressonância Plasmônica são descritos nos próximos itens.

Tamanho da partícula

Em NPs pequenas, com raio de até ~ 50 nm, o amortecimento dos elétrons reduz a intensidade e aumenta a largura da banda de ressonância, e gera uma leve diminuição na frequência de oscilação dos elétrons da NP (maiores comprimentos de onda). O amortecimento, que reduz o efeito de ressonância, pode ser causado por dois motivos: um intrínseco e outro extrínseco. O motivo intrínseco é devido à natureza do metal e sua estrutura cristalina, que determina o caminho livre dos elétrons para oscilarem. O motivo extrínseco está relacionado ao amortecimento dos elétrons por espalhamentos na superfície da NP. De fato, quanto maior a NP, maior o caminho livre dos elétrons na superfície da NP (porque se torna maior a superfície) e menor o amortecimento dos elétrons. Logo, a intensidade e a largura da absorção de ressonância aumentam com o aumento da NP (até determinado ponto; enquanto ainda for uma NP e não uma partícula) e se desloca levemente para comprimentos de onda maiores (GARCIA, 2011b; HOENER et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Essas observações podem ser visualizadas a partir da fórmula a seguir (*Equação 1*), que calcula o amortecimento dos elétrons como se fosse um oscilador harmônico, em que o primeiro termo representa o fator intrínseco, e o segundo termo o fator extrínseco:

$$\gamma = \gamma_0 + A \frac{v_F}{R}, \quad \text{em que: } \gamma_0 = \frac{v_F}{l_\infty} \quad \text{Equação 1 (GARCIA, 2011a)}$$

γ = representa o amortecimento total dos elétrons

γ_0 = representa o amortecimento dos elétrons oscilantes na superfície das NPs de forma intrínseca;

v_F = velocidade de Fermi (velocidade de condução dos elétrons);

l_∞ = caminho livre no metal;

A = é um fator fenomenológico que depende de algumas características da superfície (tensão, qualidade do cristal, facetas, espécies que envolvem a NP, etc) (GRIGORCHUK, 2018; MOROZ, 2008);

R = é o raio da NP.

Para esta faixa de tamanho (~ 50 nm), podemos supor que a NP é adequadamente descrita por um dipolo dielétrico. Para partículas de tamanhos maiores não são consideradas mais dipolos, e sim multipolos e outras considerações a mais são feitas, mas não serão abordadas neste trabalho.

Dispersão de tamanhos

Quanto maior a dispersão de tamanho das NPs, maior a largura da banda espectral. Garcia (2011) apresenta duas dispersões coloidais de prata, com distribuições de tamanho de $10 \pm 4,2$ nm, e outra de $10 \pm 8,5$ nm. A banda espectral da primeira é três vezes mais estreita que a segunda, por haver menores variações de tamanhos.

Formas

Em nanopartículas esféricas, a ressonância plasmônica não depende da direção e o ângulo de incidência da luz, por se tratar de uma forma geométrica esférica. Entretanto, para formas mais complexas o efeito de ressonância também se torna mais complexo. Para um nanobastão, que é um exemplo mais simples de ilustrar esse efeito: o acúmulo de carga na superfície do NP será diferente para as oscilações de elétrons ao longo do eixo da haste (plasmons longitudinais) e ao longo de uma direção perpendicular (plasmons transversais). Devido a esses dois modos de interações com a luz é comum ver duas bandas no espectro². Em geral, desvios na esfericidade da NP desloca a banda de ressonância para comprimentos de onda maiores (GARCIA, 2011a; KELLY et al., 2003; MARTINS; TRINDADE, 2012; MARZA; M, 2006; ZHANG et al., 2018).

² O acúmulo de carga é menor para os plasmons longitudinais que os transversais, e a força restauradora é diretamente proporcional ao acúmulo de carga, resultando, portanto, em frequências menores. Os plasmons transversais ficam quase na mesma posição das bandas de ressonância esféricas no espectro (GARCIA, 2011a; KELLY et al., 2003; MARTINS; TRINDADE, 2012).

Meio circundante

Quanto maior a constante dielétrica do meio, maior o efeito nos plasmons de superfície, levando a deslocamentos de banda para comprimentos de onda maiores e aumento da intensidade da ressonância (aumento da absorbância). Isso porque durante a excitação dos plasmons de superfície, ocorre um acúmulo de carga na interface da NP e do meio circundante, polarizando também o meio dielétrico de forma a compensar parcialmente a polarização na NP. Isso gera uma redução de carga que depende da função dielétrica do meio³ (GARCIA, 2011a; HOENER et al., 2018; KELLY et al., 2003). Ligações superficiais modificam as condições de oscilação dos elétrons (modificação da configuração eletrônica da NP) gerando variações no espectro de plasmons de superfície, como ocorre quando se utiliza agentes estabilizantes ou as NPs interagem com moléculas distintas.

Efeitos das interações com NPs:

Considerando o que foi explicado no item anterior, quanto mais próximas as NPs estiverem umas das outras, maior a influência que os campos elétricos das NPs farão umas sobre as outras. Em geral, a interação das interpartículas gera deslocamento batocrômico da banda de ressonância aumentando a largura do pico. Isso porque a influência dos campos elétricos diminui com a distância. Cada NP gera um campo elétrico pela excitação dos plasmons e a distância entre elas no meio não é uniforme, isso faz com que uma interfira na outra de forma diferente, apresentando significativas variações de amplitude. O aumento da largura do pico (variações na amplitude) é devido ao fato que as NPs não estão sob um mesmo campo elétrico resultante, mas sim ao movimento heterogêneo de elétrons nas NPs (aumento das forças elétricas) que amortecem as oscilações (como foi visto, o amortecimento leva a frequências menores, isto é, comprimento de onda maiores (GARCIA, 2011a; HOENER et al., 2018).

1.2.3.5. Nanosensores de prata (NPsAg)

Metais nobres que apresentam resistência à corrosão e oxidação, apresentam Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS), como é o caso da prata. Tal fenômeno está

³ Ao reduzir a carga na superfície da NP, reduz a força restauradora, diminuindo também a frequência ressonante, levando a aumento de intensidade (absorbância) e maiores comprimentos de onda.

associado às bandas de absorção características na região visível do espectro. Na Figura 4, a banda característica de NPsAg pode ser observada, com um comprimento de onda máximo em 400 nm. Dessa forma, a suspensão coloidal de NPs de prata e ouro, que são as mais comuns, possuem cores intensas e brilhantes, o que não ocorre na forma macro desses elementos. Também é relatado que outras nanopartículas de metais nobres são utilizadas, a platina e cobre também são exemplos em que a ressonância ocorre dentro da faixa visível no espectro por transições de banda d-d (GARCIA, 2011a; IRANIFAM, 2016; MARZA; M, 2006; NETTO-FERREIRA, 2015; PÉREZ-JUSTE et al., 2005; WANG et al., 2018b)

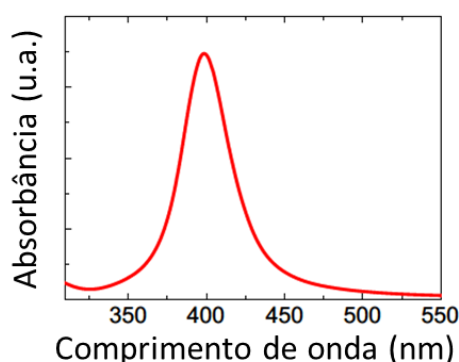


Figura 4: Espectro de absorção óptica correspondente a NPs de prata de 10 nm (Adaptado de GARCIA, 2011).

Como foi visto na seção anterior, o fenômeno de ressonância depende do tamanho e forma das NPs, constante dielétrica do meio dispersante e temperatura (BALAVANDY et al., 2014; IRANIFAM, 2016; JACKSON; MOAKES, 2000; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; NETTO-FERREIRA, 2015; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012). Com efeito, modificações na estrutura das NPs altera a cor observada das suspensões coloidais (comprimento de onda máximo de absorção da banda plasmônica e a sua largura). As NPsAg apresentam sua solução coloidal de uma cor amarelo-dourada (400 nm). Com a variação do tamanho das partículas, as cores podem variar para laranja, rosa e violeta, como mostrado na Figura 5.

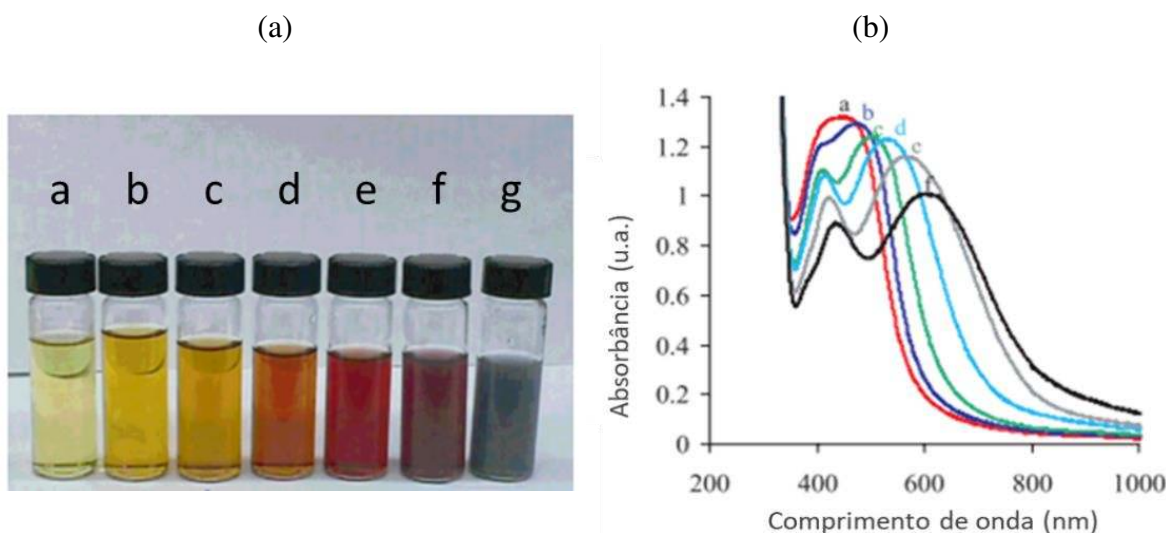


Figura 5. (a) Suspensões coloidais de nanopartículas de prata apresentando variações de cores em função do tamanho das nanopartículas. (b) Espectros de absorção para as suspensões coloidais de NPsAg em (a) (Adaptado de MURPHY; JANA, 2002).

As nanopartículas de prata (NPsAg) destacam-se devido a esse efeito de ressonância plasmônica de superfície (RPS), que possui muitas aplicações em química analítica, na detecção de diversas substâncias, em diversas áreas (AMJADI; FARZAMPOUR, 2014; FERNÁNDEZ-LODEIRO et al., 2014; HUANG et al., 2017; IRANIFAM, 2016; LIU; LU; ZHU, 2011; ROHIT; KAILASA, 2014; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012; WANG et al., 2012b, 2017; WANG; XUE; JIANG, 2011; ZHANG; WANG, 2014; ZHAO et al., 2017). Com esses nanosensores de prata é possível identificar concentrações muito baixas de analitos. Por exemplo, WANG *et al.* (2012b) utilizaram NPsAg estabilizadas com glutatona para detecção de Hg^{2+} , em partes por bilhão, (0,02 ppb) seletivamente na presença de outros cátions como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Pb^{2+} . YIN *et al.* (2017) desenvolveram um método usando NPsAg estabilizadas com β -ciclodextrina capazes de aumentar a fluorescência de fluoroquinolonas, e assim foi possível quantificá-las em soluções aquosas. Os limites de detecção da ciprofloxacina, enrofloxacin e lomofloxacin foi de, respectivamente, 170; 13 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que esses resultados obtidos com nanopartículas de prata foram de 90; 5 e 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que a presença de NPsAg torna o método fluorimétrico mais sensível.

1.2.3.6. Suspensão coloidal de NPsAg

Em uma suspensão coloidal pode ocorrer alguns tipos de interações de superfície como as coulombianas (interação repulsiva de duplas camadas de carga e, interação de moléculas de solvente - solvatação), as interações atrativas de van der Waals, e as de

repulsão estérica. A estabilização dessas suspensões pode ser explicada por meio da teoria DVLO (sigla que se refere às iniciais de seus autores, Derjaguin, Verway, Landau e Overbeek). Esta teoria descreve a estabilidade de dispersões coloidais, propondo que suas atmosferas iônicas começam a se sobrepor e uma força de repulsão é desenvolvida, isto é, essas forças repulsivas geram uma barreira energética impedindo que partículas se aproximem e se agreguem. Entretanto, quando partículas possuem energia suficiente para romper esta barreira energética, a força resultante é atrativa e permite que se unam irreversivelmente. No caso das NPsAg, a dispersão torna-se acinzentada ao flocularem, sem aquela coloração amarela característica da prata coloidal, devido ao fim do efeito plasmônico com o conseqüente crescimento das partículas (DEHGHAN MONFARED et al., 2015; HOTZA; KERAMIK, 1997; MIKELONIS; YOUN; LAWLER, 2016).

Desse modo, o preparo de uma suspensão coloidal de NPsAg utiliza excesso de borohidreto, de modo que esses ânions solvatam as nanopartículas de prata, ou se adsorvam as suas superfícies positivas, tornando-as mais estáveis em solução aquosa, através de uma estabilização eletrostática (MARTINS; TRINDADE, 2012; MELO et al., 2012; SOLOMON et al., 2007; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012; XU et al., 2011), conforme mostrado no esquema da Figura 6.

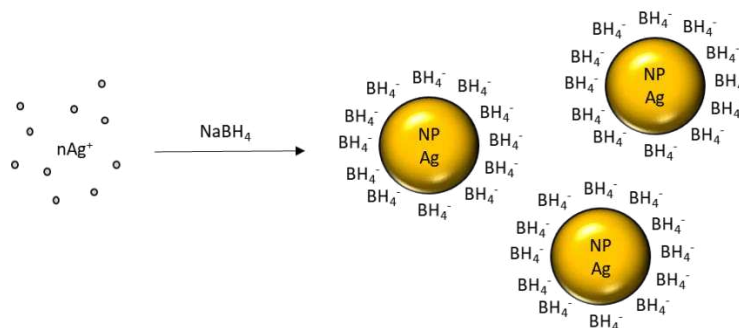


Figura 6. Representação esquemática da estabilização das NPsAg por forças repulsivas devido à presença de íons borohidreto (Adaptado de SOLOMON *et al.*, 2007).

Por isso, existe uma variedade de agentes redutores que são utilizados na síntese de nanopartículas de metais nobres devido à estabilização eletrostática e/ou estérica (DANIEL; ASTRUC, 2004; DERAYEA et al., 2017; HOTZA; KERAMIK, 1997; LALIWALA et al., 2014). Observações semelhantes foram feitas em sínteses que continham agentes redutores como o NaBH_4 , NH_2OH , N_2H_4 , $(\text{CH}_3)_2\text{NH-BH}_3$, H_2 , formaldeído, formamida, reagente de Tollens, etilenoglicol, etanol, citrato, anilina, polianilina, ácido ascórbico, quitosana, glicose, etc (AHMAD et al., 2011; HENGLEIN;

GIERSIG, 1999; HUANG; YANG, 2004; KRUTYAKOV et al., 2008; SHAMELI et al., 2011; YIN et al., 2017)

1.2.3.7. Estabilizantes de NPsAg

Existem diversos agentes estabilizantes ou protetores que contribuem para estabilização das nanopartículas. Entre eles destacam-se as aminas, açúcares, surfactantes, tióis, polímeros, dendrímeros, biomoléculas etc. Podem estar presentes em soluções aquosas, solventes orgânicos ou em filmes (NETTO-FERREIRA, 2015; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012).

Os tióis (ou tiocompostos) são compostos muito interessantes na interação com NPs metálicas. A literatura traz diversas aplicações como desagregação de nanopartículas (LI; CUI; HAN, 2009; LI et al., 2011; UEHARA; OOKUBO; SHIMIZU, 2010; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012), controle de crescimento de NPs (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001a, 2001b; ZHANG; WANG, 2014), funcionalizador de nanopartículas (WANG et al., 2012b, apresentando alta seletividade para cátions metálicos) e a principal delas passivador de superfícies de NPs (estabilizador) (BALAVANDY et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2005; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012; WANG et al., 2017). Existem variados tipos de interação que esses compostos têm com nanopartículas de ouro e prata, para identificação de diferentes analitos.

Os grupos tióis ligam-se à superfície das nanopartículas, enquanto que grupos orgânicos variados interagem preferivelmente com os analitos. Alguns métodos analíticos utilizam ligações do tipo *host guest* (VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012), interações π - π ou cátion- π (LI et al., 2010; RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2017), interações eletrostáticas e até ligações de hidrogênio (MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; UEHARA; OOKUBO; SHIMIZU, 2010). Essas ligações entre a NP estabilizada e os analitos possibilitam uma alteração na cor do sistema, tornando possível o desenvolvimento de métodos baseados em cor (LALIWALA et al., 2014; ROHIT; KAILASA, 2014).

A glutathione (GSH) (γ -Glu-Cis-Gli) é um tripeptídeo antioxidante hidrossolúvel, de cadeia longa, que contém um grupo tiol no aminoácido do meio da cadeia, a cisteína

(Figura 7). Está presente nos organismos de plantas, animais e seres humanos, e participa de importantes processos metabólicos.

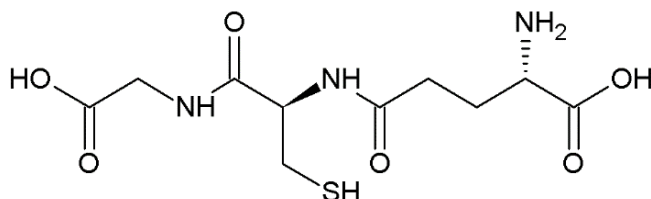


Figura 7. Estrutura da glutathiona.

A glutathiona possui muitos grupos funcionais como os grupos carboxila, amida, tiol e amino, que fornecem uma interface hidrofílica, que orienta a reatividade com outros analitos facilitando ou dificultando a interação com outras moléculas, funcionalizando as nanopartículas (BALAVANDY et al., 2014; RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2017). Além disso, são capazes de formar complexos com íons metálicos (LI; CUI; HAN, 2009; WANG et al., 2012a, 2017) e com outros compostos orgânicos, principalmente bioquímicos (BALAVANDY et al., 2014; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2017). Quando estabilizantes estão acoplados às nanopartículas metálicas, ocorre uma modificação da configuração eletrônica das NPs devido às ligações superficiais, modificando as condições de oscilação dos elétrons, gerando variações no espectro de RSP (GARCIA, 2011a).

Devido a superfície positiva das NP_sAg, os grupos negativamente carregados, carboxil ($-\text{COO}^-$) e principalmente o tiol ($-\text{SH}$) da GSH, se ligam à prata por meio de ligações de van der Waals (BALAVANDY et al., 2014; LI et al., 2011). Pode-se ver na Figura 8 como ocorre essa estabilização.

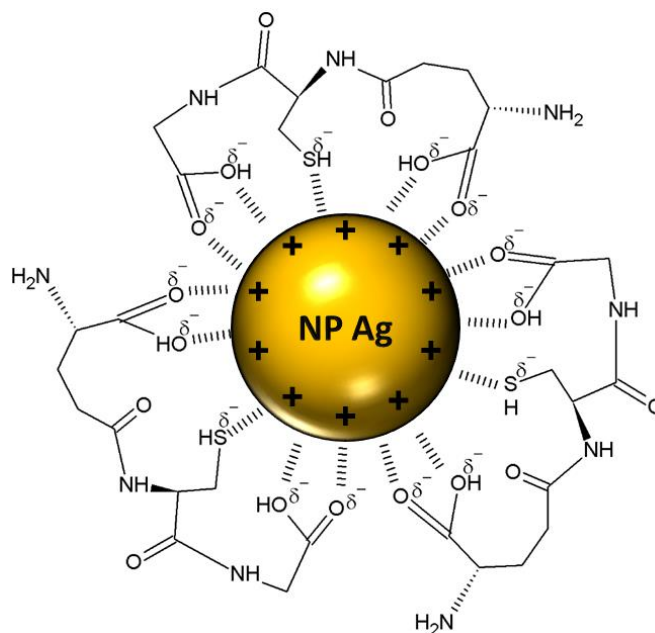


Figura 8. Esquema de estabilização das nanopartículas de prata com glutatona (adaptado de BALAVANDY *et al.*, 2014).

Vários trabalhos são citados na literatura. RAJAMANIKANDAN e ILANCHELIAN (2017) relatam um método colorimétrico para a detecção sensível e seletiva de tiamina (Vitamina B1) por nanopartículas de prata (NPsAg) com superfície modificada por glutatona. O interessante deste trabalho é que a glutatona foi adicionada às nanopartículas após a síntese delas, e não como um reagente no processo de redução química, como é frequente na literatura. Foram utilizadas diversas técnicas para caracterização desse material, sendo realizado um estudo das interações das NPs, glutatona e analitos juntos, além de teste de seletividade com compostos de estrutura semelhante. O limite de detecção mais baixo atingiu $50,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, e o método foi aplicado em sangue e urina humanos.

1.2.3.8. Técnicas de caracterização de nanopartículas

Propriedades úteis e interessantes das nanopartículas, principalmente as anisotrópicas, foram apresentadas. Contudo é necessário caracterizá-las (sua composição química, forma, tamanhos e distribuição de tamanhos, etc.), para que se possa estabelecer uma relação entre as propriedades físico-químicas e as suas características naturais conhecendo, assim, o nanomaterial em análise. Para isso, é preciso utilizar equipamentos capazes de interagir com a matéria a nível molecular e atômico para coletar informações sobre essas estruturas.

Existem diversas técnicas de caracterização de nanopartículas, cada uma fornecendo variadas informações, com diferentes objetivos, complexidades, custos e limitações; para o tipo de material a ser analisado, o que torna algumas técnicas mais escolhidas ou propícias que outras. A Tabela 2 apresenta as técnicas mais conhecidas e mais utilizadas na caracterização de nanopartículas.

Tabela 2. Principais técnicas usadas na caracterização de nanopartículas. (Adaptado de PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010)

Técnica	Aplicação / Características
Difração de raios X	Estrutura cristalina, tamanho da partícula
Espalhamento dinâmico de luz	Tamanho de partículas (suspensão), distribuição de tamanhos
Sedimentação por centrifugação	Distribuição por tamanhos/complexo
Cromatografia de exclusão por tamanho	Análise de tamanhos e distribuição de tamanhos e quantificação (principalmente em testes toxicológicos). Boa resolução, pequeno volume de amostra/lenta
Microscopia de força atômica	Boa resolução de imagens 3D apresentando informações topográficas, magnéticas, elétricas, estruturais, química etc. Entretanto só analisa a superfície dos nanomateriais.
Área superficial específica (BET)	Tamanho das partículas, área superficial, simples, considera as partículas como esferas monodispersas
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Morfologia das superfície, tamanho das partículas/boa resolução
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	Análise de tamanhos e estrutura local e morfologia
Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX)	Composição da superfície e mapeamento elementar
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)	Análise química da superfície
Espectrofotometria de absorção molecular	Identifica e fornece a concentração (suspensão coloidal)

A técnica mais utilizada na caracterização de nanosensores de prata é a espectrofotometria de absorção molecular. Em praticamente toda literatura revisada esta técnica foi utilizada. Portanto, a espectrofotometria de absorção molecular (EAM – UV/Vis) (MELO et al., 2012; SOLOMON et al., 2007) e o espalhamento dinâmico de luz (DLS) (BHATTACHARJEE, 2016; LALIWALA et al., 2014; MENDES et al., 2014; RAGHUWANSHI et al., 2018; ROHIT; KAILASA, 2014; SUTARIYA et al., 2016;

UEHARA; OOKUBO; SHIMIZU, 2010) foram as técnicas utilizadas para caracterização da dispersão coloidal de prata neste trabalho.

1.2.3.8.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O Espalhamento Dinâmico de Luz (em inglês DLS, *Dynamic Light Scattering*), também conhecido como Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS - *Photon Correlation Spectroscopy*), é uma técnica de caracterização que mede o tamanho e a distribuição de tamanho de partículas em sistemas coloidais e dispersões, através da incidência de um feixe de laser e da análise da dispersão em frequência da luz espalhada, ou da função de correlação temporal da intensidade espalhada causadas pelo movimento browniano das partículas. A técnica também é conhecida como espalhamento de luz *quasi-elástico*, devido ao fato da energia do feixe de luz incidente ser quase idêntica ao da luz emitida, não totalmente idêntica por causa de efeito Doppler⁴ resultante do movimento browniano das partículas (HOULTON, 1956; PECORA, 2013; SAKHO et al., 2017).

A técnica consiste na incidência de um feixe de luz laser polarizado verticalmente no material a ser analisado. A luz interage com a matéria levando à emissão da luz em todas as direções (espalhamento Rayleigh), praticamente no mesmo comprimento de onda (espalhamento *quasi-elástico*). Normalmente a luz espalhada passa por um polarizador que seleciona a polarização vertical e, em seguida, passa pelo detector que é um contador de fótons. Geralmente a intensidade espalhada é medida em função do ângulo de espalhamento (BHATTACHARJEE, 2016; HOULTON, 1956; PECORA, 2013).

A luz é espalhada porque ela exerce uma força oscilante nas cargas presentes nos átomos criando um dipolo elétrico nas partículas e, quando o dipolo muda, há a emissão de radiação. A luz emitida pelas partículas e coletada pelo detector sofre interferências construtivas ou destrutivas variando com o tempo, gerando, assim, alterações na

⁴ Como as partículas apresentam movimento browniano, ocorre efeito Doppler com a luz, podendo mudar minimamente as frequências, e conseqüentemente, o comprimento de onda da luz. Quanto menores as partículas, maior a velocidade de difusão delas no meio, maior o efeito Doppler e, quanto maiores as partículas, menor a velocidade de difusão, e portanto, menor o efeito Doppler. Quando esse efeito é extremamente pequeno, as energias dos fótons incidentes e espalhados são praticamente iguais e isso resulta em um espalhamento *quasi-elástico*.

intensidade total da luz. Variações mais rápidas na intensidade da luz espalhada ocorrem com pequenas partículas, por terem maior velocidade de difusão. Variações mais lentas na intensidade da luz, por outro lado, ocorre com partículas maiores, por terem velocidades menores (HOULTON, 1956; PECORA, 2013; SAKHO et al., 2017).

Para analisar a mobilidade das partículas e obter a distribuição de tamanho delas pela luz espalhada é calculado, inicialmente, $g^{(2)}(\tau)$, que é a função de auto-correlação temporal da intensidade espalhada, $I(t)$, normalizada (Equação 2).

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad \text{Equação 2}$$

A distribuição de tamanhos é dada considerando que cada tamanho de partícula contribui com um decaimento exponencial para a função de correlação cuja taxa de decaimento Γ é função da difusão das partículas que estão sendo medidas. Assim a função de correlação é expressa por:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \int_0^{\infty} A(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad \text{Equação 3}$$

Em que β é uma constante do equipamento, e $A(\Gamma)$ é a amplitude de espalhamento para uma partícula de raio R_H onde:

$$\Gamma = D_T q^2 \quad \text{Equação 4}$$

Em que D_T representa o coeficiente de difusão translacional e q é o módulo do vetor de espalhamento. O vetor de espalhamento pode ser determinado pela seguinte equação:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{Equação 5}$$

Em que n é o índice de refração do solvente, λ_0 é o comprimento de onda do laser no vácuo, e θ é o ângulo de espalhamento.

O coeficiente de difusão relaciona-se com o raio hidrodinâmico das partículas (R_H), usando a equação de Stokes-Einstein onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, e η é a viscosidade do dispersante.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_T} \quad \text{Equação 6}$$

O raio hidrodinâmico representa o raio de uma partícula esférica de mesmo coeficiente de difusão.

A distribuição de tamanhos é dada, finalmente, pela função $A(\Gamma)$ em que cada taxa de decaimento é relacionada ao raio hidrodinâmico R_H pelas Equações 4 a 6.

O DLS é extensivamente utilizado para determinar o tamanho de nanopartículas, com vantagens de curto tempo de medição, por ser uma técnica não-invasiva e não necessitar de preparações das amostras como secagem e recobrimento.

1.2.3.8.2. Espectrofotometria de Absorção Molecular (EAM – UV/Vis)

A espectrofotometria de absorção molecular (EAM – UV/Vis) é uma das técnicas de análise mais comuns entre os químicos, medida por aparelhos simples chamados espectrofotômetros. Baseia-se na medição de luz absorvida por uma dada solução contendo o analito. Nestes equipamentos são utilizadas fontes de luz na faixa do visível (entre 350 e 750 nm), do ultravioleta (abaixo de 350 nm) próximo e do infravermelho próximo (acima de 750 nm). Nessas faixas de energia ocorrem transições eletrônicas moleculares (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Uma luz branca emitida por uma fonte é direcionada a um monocromador, feixes de diversos comprimentos de onda são separados, gerando um espectro contínuo de emissão. Esses feixes de luz percorrem a amostra, que está contida em uma cubeta, cujo material deve ser transparente à luz emitida. Os raios que não são absorvidos pela amostra chegam ao detector, que geram o sinal analítico. Pode-se, portanto, obter um espectro de absorbância no modo varredura ou medir o valor da absorbância em determinado comprimento de onda (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Por essa técnica, por exemplo, é possível estudar o comportamento das nanopartículas de prata pelo surgimento de uma banda devido à ressonância plasmônica. Segundo a lei de Beer-Lambert-Bouger (Equação 7), a concentração do analito pode ser determinada devido a uma relação linear entre absorbância, e concentração.

$$A = \epsilon b[a] \quad \text{Equação 7}$$

ε é absorvidade molar, uma constante que é função, principalmente, do comprimento de onda da radiação, da espécie química absorvedora da radiação e do solvente;

b é o caminho óptico percorrido pela luz (dada pela largura da cubeta)

$[a]$, é a concentração no equilíbrio da espécie absorvente.

1.2.4. Validação de métodos analíticos

A validação de um método é uma forma de avaliar a qualidade de um método em gerar informações confiáveis daquilo que se propõe a fazer, fornecendo evidências experimentais por meio de alguns parâmetros que devem ser atendidos. Os principais órgãos regulamentadores em validação de métodos no Brasil são o INMETRO (BRASIL, 2016), ANVISA (ANVISA, 2017, 2018) e MAPA (BRASIL, 2011a, 2011b).

A validação de um método decorre por meio de ensaios destinados a obter dados de alguns parâmetros, os quais são comparados aos valores preconizados pelo órgão regulamentador. Para alguns parâmetros, essa avaliação envolve uma análise estatística. Esses parâmetros ou figuras de mérito, como também são conhecidas, apresentam limites de valores que aquele método deve apresentar para ser adequado para uma dada finalidade, isto é, seja validado. As figuras de mérito que demonstram que um método é válido, segundo a classificação II (quantitativo) da ANVISA são: seletividade, faixa linear de trabalho, veracidade, repetitividade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação e robustez, que são os mesmos empregados para validação neste trabalho por se enquadrar nesta categoria.

1.2.4.1. Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar somente o analito de interesse na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra, os quais compõem a matriz da amostra.

1.2.4.2. Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho é um intervalo especificado onde é possível demonstrar a capacidade de um método analítico de relacionar resultados obtidos diretamente com a concentração do analito na amostra. Recomenda-se que essa faixa seja determinada pela

análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2017). Dessa forma, os padrões em concentrações conhecidas são analisados, obtendo-se a resposta analítica (absorbância em caso de um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis). Constrói-se um gráfico com os dados obtidos, i.e., resposta analítica em função da concentração do analito. Faz-se a regressão linear dos pontos obtidos pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se os parâmetros da equação da reta. A qualidade do ajuste é avaliada pelo gráfico de resíduos e sua avaliação estatística e também pelo coeficiente de determinação (R^2).

1.2.4.3. Veracidade

A veracidade de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais das medidas em relação aos valores teóricos delas. Este parâmetro pode ser determinado por meio de ensaios de recuperação, em que amostras brancas (sem a presença do analito) são fortificadas com quantidades conhecidas do padrão. Os resultados obtidos são comparados com os resultados teóricos, sendo geralmente expressos como porcentagem de recuperação ($R\%$), calculados de acordo com a Equação 8.

$$R(\%) = \frac{\bar{x} \cdot 100}{x} \quad \text{Equação 8}$$

Em que, $R(\%)$ = porcentagem de recuperação, \bar{x} = média das concentrações do analito determinadas experimentalmente e x = concentração teórica correspondente (valor esperado obtido a partir da quantidade de padrão adicionada às amostras brancas).

1.2.4.4. Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária)

A precisão deve avaliar a proximidade entre os valores dos resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão é usualmente expressa por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

A repetitividade ou precisão intra-dia, apresenta concordância entre os resultados em um curto período de tempo, com mesmo analista e mesma instrumentação. É representada calculando-se o coeficiente de variação (CV) das repetições de determinada medida pela dispersão dos resultados, conforme a (Equação 9). Em que DP é a estimativa do desvio padrão das repetições e CMD , a concentração média determinada.

$$CV = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

A precisão intermediária ou precisão inter-dias apresenta concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, podendo-se variar os analistas e/ou equipamentos, analisando as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetitividade.

1.2.4.5. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD é calculado conforme a *Equação 10*

$$LD = \frac{3,3 \times DPb}{s} \quad \text{Equação 10}$$

Em que, *DPb* é o desvio padrão de 10 medidas do branco, e *s* é a sensibilidade da curva que é dada pelo coeficiente angular da equação da curva de calibração.

1.2.4.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é calculado conforme a *Equação 11*.

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{s} \quad \text{Equação 11}$$

Em que, *DPb* é o desvio padrão de 10 medidas do branco, e *s* é a sensibilidade da curva que é dada pelo coeficiente angular da equação da curva de calibração.

1.2.4.7. Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método (ANVISA, 2017). Cada técnica analítica requer condições específicas relativas ao equipamento que garantam a robustez do método a ser desenvolvido. No caso da EAM – UV/Vis, as condições que garantem inicialmente a robustez de um método qualquer, dependem da ausência de variações do pH e a utilização dos mesmos lotes e soluções.

Entretanto, cada método desenvolvido tem sua robustez avaliada baseada em outros fatores além desses (que são intrínsecos ao equipamento), como a estabilidade das soluções, ordem de adição dos reagentes e etc.

1.3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método quantitativo para determinação de fluoroquinolonas (CIP, NOR e ENRO) empregando nanopartículas de prata em sistemas aquosos.

1.3.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas de prata e caracterizá-las por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectrofotometria de Absorção Molecular;
- Avaliar os fatores que influenciam a detecção das fluoroquinolonas, como concentração de NPsAg, concentração dos fármacos, uso de estabilizantes e tempo de análise;
- Validar o método para determinação de Fluoroquinolonas com NPsAg estabilizadas;
- Determinar a concentração de fluoroquinolonas em amostra de água tratada.

CAPÍTULO 2:
Materiais e Métodos

2.1. Padrões e Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3. Todas as soluções foram preparadas com água Tipo 1 (da marca Millipore, modelo Milli-Q® Reference).

Tabela 3: Reagentes utilizados neste trabalho.

Reagente	Marca	Pureza %
Nitrato de Prata	Neon	99,8
Amoxicilina Trihidratada	Sigma-Aldrich	98
Ciprofloxacino	Sigma-Aldrich	98
Norfloxacino	Sigma-Aldrich	98
Enrofloxacino	Sigma-Aldrich	98
Cafeína	SPLabor	100
Cefadroxil	Sigma-Aldrich	98
Ceftriaxona Dissódica	Sigma-Aldrich	98
Cefalexina	Sigma-Aldrich	98
Penicilina G	Sigma-Aldrich	100
Glutationa	Sigma-Aldrich	98
Tiuréia	SPLabor	99
EDTA	Dinâmica	99
PVP	Sigma-Aldrich	99,9
Citrato trissódico	Sigma-Aldrich	99
Borohidreto de Sódio	Neon	98

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Agitador magnético	SoLab	SL 91
Balança Analítica	Acculab	ALC-210.4
Espectrofotômetro de Absorção Molecular	Thermo Scientific	Evolution Array
Espalhamento Dinâmico de Luz	Brookhaven Co.	Sistema BI-200SM e correlacionador TurboCorr
Condutivímetro	AZ	86503

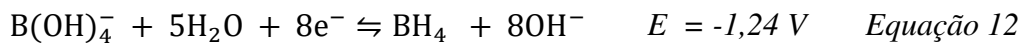
2.3. Preparo das Soluções

As soluções de amoxicilina trihidratada, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina, cafeína, cefadroxil, ceftriaxona dissódica, cefalexina, penicilina G e glutationa foram preparadas em concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para as soluções de

ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina e amoxicilina, usaram-se 0,02% (v/v) de ácido acético para solubilização dos padrões e, por fim, armazenadas em geladeira a 10 °C.

2.4. Síntese dos Nanosensores

Foi utilizada a síntese por redução química proposta por Lee e Meisel (1982) e que consiste na redução da prata, sendo usado AgNO_3 , por excesso de borohidreto (NaBH_4). Para isso, 25,00 mL da solução estoque de nitrato de prata ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionada à 75,00 mL de uma solução de NaBH_4 ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), sob um fluxo de $0,1 \text{ mL s}^{-1}$. O sistema foi mantido sob agitação constante. O teor final teórico da suspensão de NPsAg foi de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sem a necessidade de nenhuma etapa de purificação. O processo é termodinamicamente favorável, como mostrado pela *Equação 12* e *Equação 13*.



As nanopartículas sintetizadas foram armazenadas sob refrigeração a 10 °C. A caracterização das nanopartículas foi feita pelo monitoramento da banda de ressonância plasmônica característica da prata coloidal (400 nm).

2.5. Caracterização das nanopartículas de prata

Para caracterização das NPsAg utilizou-se o Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV/Vis do Departamento de Química da UFV, da marca Thermo Scientific modelo Evolution Array com detector de arranjo de fotodiodos, e uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico na faixa de 190 a 1100 nm. Para a quantificação dos fármacos foi monitorado apenas o comprimento de onda (400 nm).

Além do espectrofotômetro, as nanopartículas também foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz em um equipamento da Brookhaven Co. (sistema BI-200SM e correlacionador TurboCorr) do departamento de Física da UFV. A fonte de luz usada foi um laser de HeNe ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). Para tanto, as NPsAg foram diluídas em água à temperatura de $(25,0 \pm 0,5) \text{ °C}$ e filtradas em um filtro de nylon com poros de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (MilliPore). O ângulo de espalhamento fixado em 30° . A função de auto-

correlação da intensidade de luz espalhada foi medida e os dados foram ajustados pelo modelo NNLS (método de análise dos Mínimos Quadrados Não-Negativos – do inglês *non negative least squares*) (BROWN, 1993), para obter a distribuição de tamanhos das NPsAg puras e das NPsAg estabilizadas.

2.6. Estabilização das NPsAg com glutatona

A influência do estabilizante glutatona foi avaliada na detecção dos fármacos, sendo usada a ciprofloxacina como molécula modelo das FQs. Para isso, foram construídas duas curvas analíticas, curva (1) sem adição da glutatona, enquanto a curva (2) foi realizada com adição de glutatona. A faixa de concentração das curvas analíticas variou entre $8,33 \times 10^{-5}$ e $8,33 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A concentração de GSH foi mantida constante em $8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, assim como o teor das NPsAg ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Cada padrão foi preparado e rapidamente analisado. As análises foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis e Espalhamento Dinâmico de Luz.

2.7. Cinética das reações

A cinética de aglomeração das NPsAg foi avaliada mediante a adição do fármaco ($2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) à dispersão coloidal de NPsAg estabilizadas com GSH ($9,04 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Após a mistura, o sistema foi rapidamente homogeneizado e feita a medida da absorbância, em 400 nm e do deslocamento de meia altura na região de ~520 nm, no espectrofotômetro em tempos que variaram entre 0 e 360 s. As análises foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis.

2.8. Nanosensores de fluoroquinolonas

2.8.1. Desenvolvimento e validação do método

Para determinação quantitativa das fluoroquinolonas foram construídas curvas analíticas para os três fármacos (ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina) em que foi utilizada uma suspensão coloidal de NPsAg ($1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e GSH ($5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em diferentes concentrações de fármacos de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os padrões foram preparados por diluição das soluções estoque no momento das análises, sendo que as leituras das amostras no espectrofotômetro foram realizadas no tempo de 20 s após a mistura (NPs + GSH + Fármaco). As análises foram realizadas no

espectrofotômetro (Thermo Scientific modelo Evolution Array), com uma cubeta de quartzo de 1 cm de diâmetro. O comprimento de onda monitorado foi o de 400 nm.

Para validação do método foram determinados os parâmetros faixa linear de trabalho, limite de quantificação, veracidade, repetitividade, precisão intermediária e seletividade. A veracidade e repetitividade do método foram avaliadas em dois níveis de concentração ($1,99 \times 10^{-5}$ e $2,97 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) pelo procedimento de recuperação, com cinco repetições em cada nível. A precisão intermediária foi realizada em três dias distintos nas mesmas condições de repetitividade. Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelas Equações 9 e 10.

A avaliação da seletividade das NPsAg foi feita adicionando-se 1000 µL de soluções de cafeína, penicilina G, cefadroxil, ceftriaxona, cefalexina, amoxicilina (todos na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) à 1000 µL da solução contendo NPsAg ($2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) com e sem GSH ($2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), por meio de inspeção visual (mudança de cor) e monitoramento de absorção em 400 nm.

2.9. Análise de uma amostra autêntica de água

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de ciprofloxacina em uma amostra de água captada e tratada do Ribeirão São Bartolomeu pela empresa de saneamento da cidade de Viçosa, MG – Brasil seguindo os mesmos procedimentos experimentais do item anterior.

Da mesma forma, os padrões foram preparados por diluição das soluções estoque de CIP no momento das análises. As medidas de absorbância das amostras foram realizadas no tempo de 20 s após a mistura NPs ($1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) + GSH ($5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) + Fármaco. As análises foram realizadas no espectrofotômetro (Thermo Scientific modelo Evolution Array), com uma cubeta de quartzo de 1 cm de diâmetro. O comprimento de onda monitorado foi o de 400 nm.

Foi construída uma curva analítica com superposição de matriz, ou seja, a amostra de água foi fortificada com as concentrações desejadas de CIP e obtida a faixa de trabalho. O método de análise também foi validado em água tratada, sendo determinados os parâmetros de faixa linear de trabalho, limites de quantificação, veracidade e repetitividade. A veracidade e repetitividade do método foram avaliados em

dois níveis de concentração ($1,04 \times 10^{-5}$ e $1,74 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) pelo procedimento de recuperação, com cinco repetições em cada nível.

Também foi realizado um ensaio em condutivímetro em uma amostra de água tipo 1 e outra amostra de água tratada a uma temperatura de aproximadamente 25°C para avaliar a influência de íons no efeito de matriz. O equipamento utilizado foi da marca AZ modelo 86503, e com eletrodo de platina.

CAPÍTULO 3:
Resultados e Discussão

3.1. Síntese e caracterização das NPsAg

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese das NPsAg via método de redução usando borohidreto e sua caracterização foi feita por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis. A dispersão coloidal de NPsAg apresentou uma coloração amarela (Figura 9), sendo observada uma banda de ressonância plasmônica localizada (RPS) na região do visível em 400 nm, característica dessas nanopartículas, comprovando a formação da prata coloidal (GARCIA, 2011a; HORIKOSHI; SERPONE, 2016; HUANG; YUAN; YANG, 2004; MELO et al., 2012; MURPHY; JANA, 2002; STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010; WANG et al., 2012b).

Diferentes lotes podem apresentar pequenas diferenças de comprimento de onda máximo das bandas de RPS, pois está relacionado a pequenas variações de uma síntese para outra. Por isso, foram obtidas suspensões de nanopartículas em que o comprimento de onda máximo variou de 396 a 403 nm.

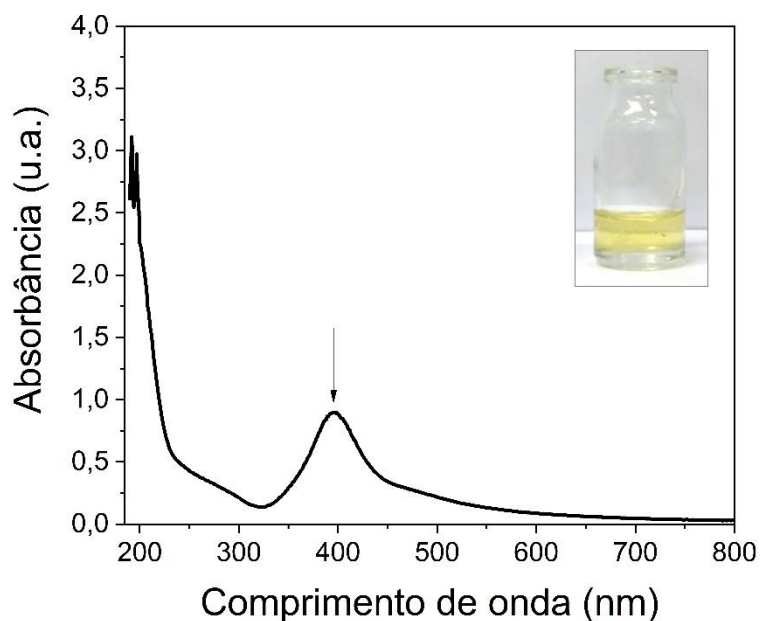


Figura 9. Espectro UV/Vis da dispersão coloidal de nanopartículas de prata (teor $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com banda de ressonância plasmônica em $\sim 400 \text{ nm}$.

Para descobrir o tamanho das NPsAg ($1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), foram feitas medidas de espalhamento dinâmico de luz das nanopartículas pelo método NNLS (Figura 11 e Figura 10) nas NPs com filtração (filtro de nylon de $0,22 \mu\text{m}$) e sem filtração.

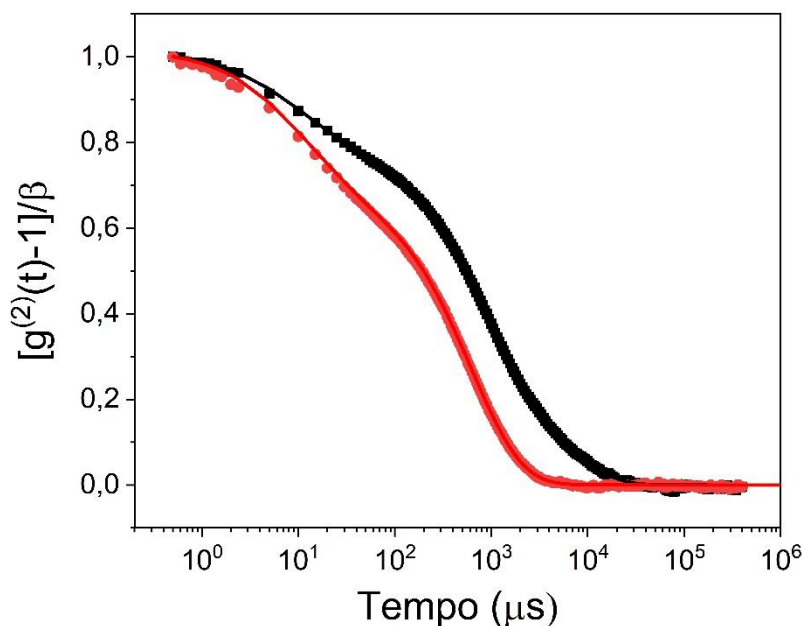


Figura 10. Função de correlação da intensidade da luz espalhada normalizada em função do tempo das NPsAg ($1.25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), \bullet (NPsAg filtradas), \blacksquare (NPsAg não filtradas) e as linhas contínuas correspondem ao ajuste nas respectivas cores.

Na Figura 10, pode-se observar as curvas de correlação NNLS normalizadas das duas suspensões de NPsAg, isto é, filtrada e não filtrada, bem ajustadas com os dados experimentais. A curva em vermelho possui um tempo de correlação (tempo de decaimento) menor que a curva em preto, demonstrando assim um menor espalhamento e, portanto, um indício de uma população de partículas menores. A partir do comportamento da curva de correlação é determinado o coeficiente de difusão e então, obtido o diâmetro das partículas por meio da Equação 3, via *software*.

As amostras de NPsAg foram medidas, primeiramente, sem filtração, e foram observadas duas populações de tamanhos com 31,5 nm e 390 nm de diâmetro (Figura 11), sendo a última uma aglomeração de NPs. O aglomerado interfere no sinal, pois partículas muito grandes espalham muito a luz, podendo mascarar a baixa intensidade de luz espalhada por partículas menores. De fato, ao filtrar a suspensão de nanopartículas de prata, observou-se apenas uma distribuição de tamanhos (diâmetros), com pico um pouco mais intenso em 38 nm. De modo a investigar melhor as propriedades das nanopartículas, desconsideramos as partículas maiores, isto é, os agregados.

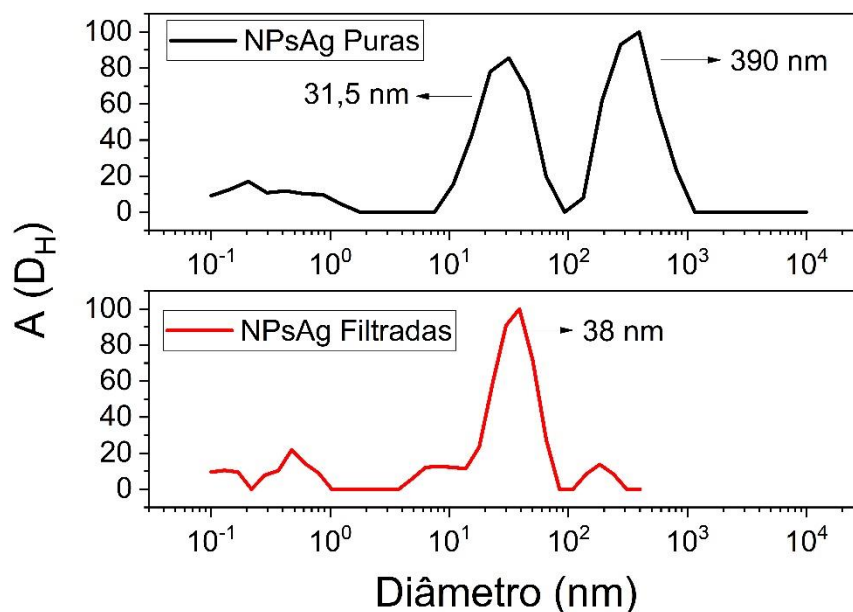


Figura 11. Representação das distribuições de tamanhos das NPsAg não-filtradas (a) e as NPsAg filtradas (b).

3.2. Detecção das fluoroquinolonas

Suspensões coloidais de nanopartículas metálicas com alto valor de absorvidade, como é o caso da prata, apresentam diferentes cores na região visível quando estão dispersas em comparação de quando estão agregadas. Diante disso, o uso das NPsAg como nanosensores de fluoroquinolonas foi investigado ao adicionar diferentes concentrações de ciprofloxacina às NPsAg. Como pode ser visto no insert da Figura 12, a cor da suspensão é modificada de amarelo para rosa.

De acordo com a Figura 12, ocorre a diminuição da banda de absorção em 400 nm e deslocamento batocrômico em direção a comprimentos de onda maiores, chegando a 520 nm. Essa alteração no espectro de absorção na região do visível é devido à agregação das nanopartículas. Resultados semelhantes foram obtidos para NOR (Figura 13).

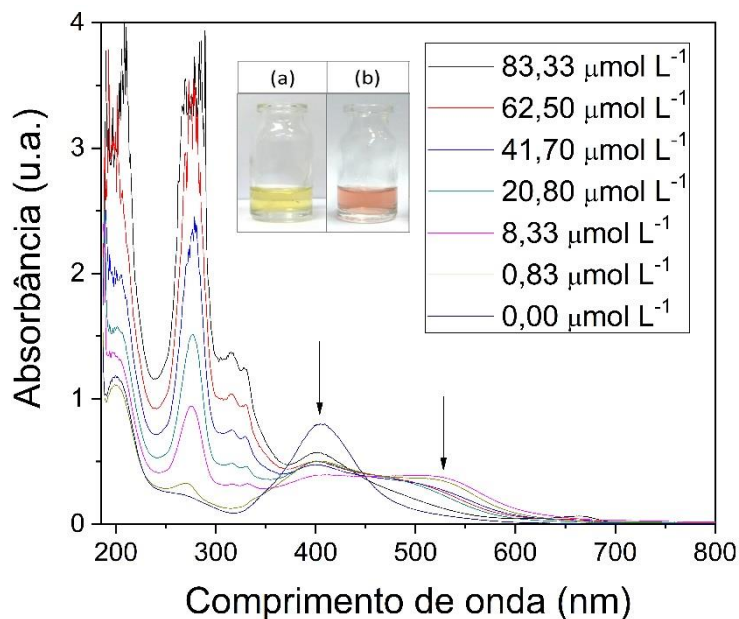


Figura 12. Espectros UV/Vis das NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com deslocamento da RPS de 400 para $\sim 530 \text{ nm}$ na presença de CIP (variando de 0 a $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). As setas indicam os λ mencionados. Insert: Fotografia das NPsAg puras (a) NPsAg com CIP (b).

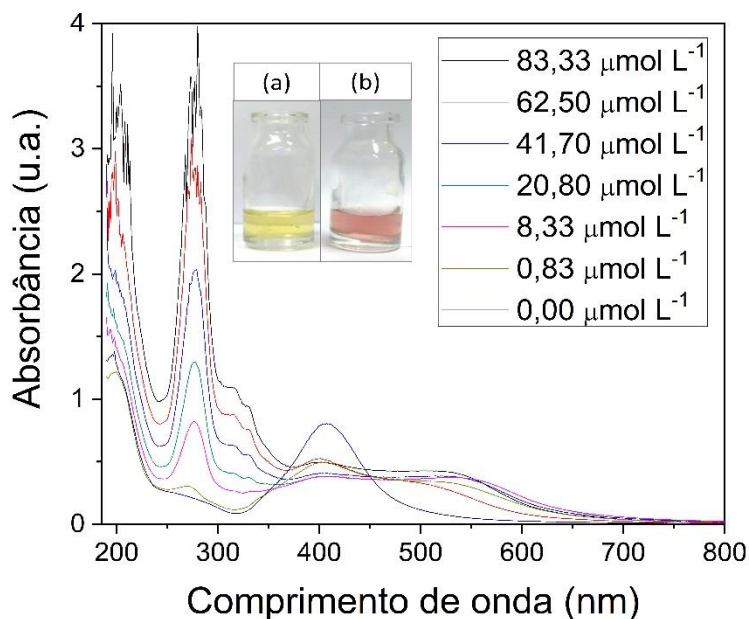


Figura 13. Espectros UV/Vis das NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com deslocamento da RPS de 400 para 530 nm na presença de NOR (variando de 0 a $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). As setas indicam os λ mencionados. Insert: Fotografia das NPsAg puras (a) NPsAg com NOR (b).

Pode ser observada a presença de picos na região de 275 nm e 320 nm da CIP, que aumentam de intensidade à medida que se aumenta a concentração do fármaco. Essas

bandas de absorção são referentes aos grupos cromóforos presentes na molécula, um anel básico piperazinil (ou outro N-heterocíclico) na posição 7 da estrutura quinolônica, e uma função carboxílica na posição 3 (Quadro 2, Quadro 3 e Quadro 4, nas páginas 12, 13 e 14, respectivamente).

As duas bandas de absorção características das FQs podem variar de 260-300 nm na primeira (com coeficiente de absorvidade molar entre $2,0$ e $2,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e a segunda 320-340 nm (com coeficiente de absorção molar de cerca de $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ALBINI; MONTI, 2003; YIN et al., 2017). A posição e a intensidade das bandas abaixo de 250 nm dependem intrinsecamente da estrutura da molécula, que difere uma quinolona da outra. Isso porque as FQs apresentam comportamento ácido-base de Bronsted. A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de grupos básicos (amina terciária) atribui à molécula propriedades anfóteras, apresentando diferentes espécies na solução dependendo do pH através da protonação e desprotonação desses grupos. As quinolonas podem existir sob as formas catiônica, aniônica ou zwitteriônica (UIVAROSI, 2013; ZANCHETTA; PENA; GONÇALVES, 2015). Ao utilizar NPsAg, a determinação de FQs passa a ser monitorada em comprimentos de onda visíveis (400 nm e ~530 nm), diminuindo a interferência de outros compostos orgânicos presentes na matriz que também são determinados no ultravioleta.

Em suma, os fenômenos observados acontecem porque as fluoroquinolonas ligam-se à superfície positiva das NPsAg, enfraquecendo a estabilização eletrostática. Dessa forma, as NPsAg agregam-se por meio de interações de van der Waals (MELO et al., 2012; QI; WANG, 2004; QI; WANG; XU, 2003; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012; WAKUDA; HATAMURA; SUGANUMA, 2007), alterando seu estado de confinamento quântico. Isto é, modificando as transições eletrônicas que ocorriam anteriormente somente nas NPs, e que depois após a adição de FQs no meio reacional, passa a ocorrer entre as NPs e as FQs ao redor (ligadas às NPs). Dessa forma a banda de RSP é alterada, fenômeno que é evidenciado pela mudança de cor (DANIEL; ASTRUC, 2004; KELLY et al., 2003; MARTINS; TRINDADE, 2012; MELO et al., 2012; NETTO-FERREIRA, 2015; STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010; XU et al., 2011), como pode ser observado no esquema da Figura 14.

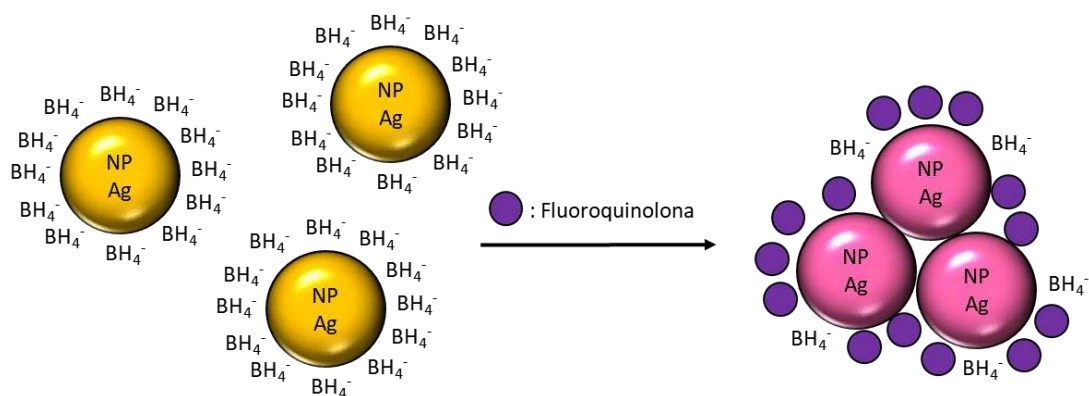


Figura 14. Representação esquemática do mecanismo de agregação das NPsAg responsável pela determinação de FQs (Adaptado de XU et al., 2011)

Também é esperado um desvio para o vermelho (fótons com menor energia), com o alargamento do pico e diminuição da intensidade de absorção da banda RSP, quando a distância entre as nanopartículas se torna menor do que a soma de seus raios (RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2017) e também quando o tamanho das nanopartículas aumenta (BALAVANDY et al., 2014). Esse fenômeno é explicado pelo modelo teórico multicamada de Mie, que considera a dupla camada iônica em torno das NPsAg, gerada pela estabilização eletrostática do borohidreto, as quais superam as forças atrativas de Van der Waals entre as nanopartículas. Dessa forma, a interação química entre as NPsAg e as FQs reduz a condutividade eletrônica na camada atômica mais externa das NPs e, conseqüentemente, causa os desvios para o vermelho (BALAVANDY et al., 2014; GARCIA, 2011a)

É possível comprovar esse fenômeno de agregação das NPsAg por meio dos resultados obtidos pelo DLS. Na Figura 15b, os losangos em preto representam os diâmetros medidos em função do tempo, sendo que cada ponto representa o diâmetro máximo de uma distribuição de tamanhos. A curva em preto é apenas um ajuste para melhor visualização dos dados, em que se observa um aumento no diâmetro das NPsAg em função do tempo na presença de CIP. De igual modo, observa-se que a curva em vermelho apresenta um aumento na intensidade da luz espalhada, acompanhando a curva em preto. Afinal, a intensidade está relacionada ao tamanho, a quantidade e a difusão das NPs na suspensão. Como visto no item 1.2.3.8.1 (página 29), partículas maiores espalham mais a luz, demonstrando assim um aumento do tamanho delas, e vice-versa.

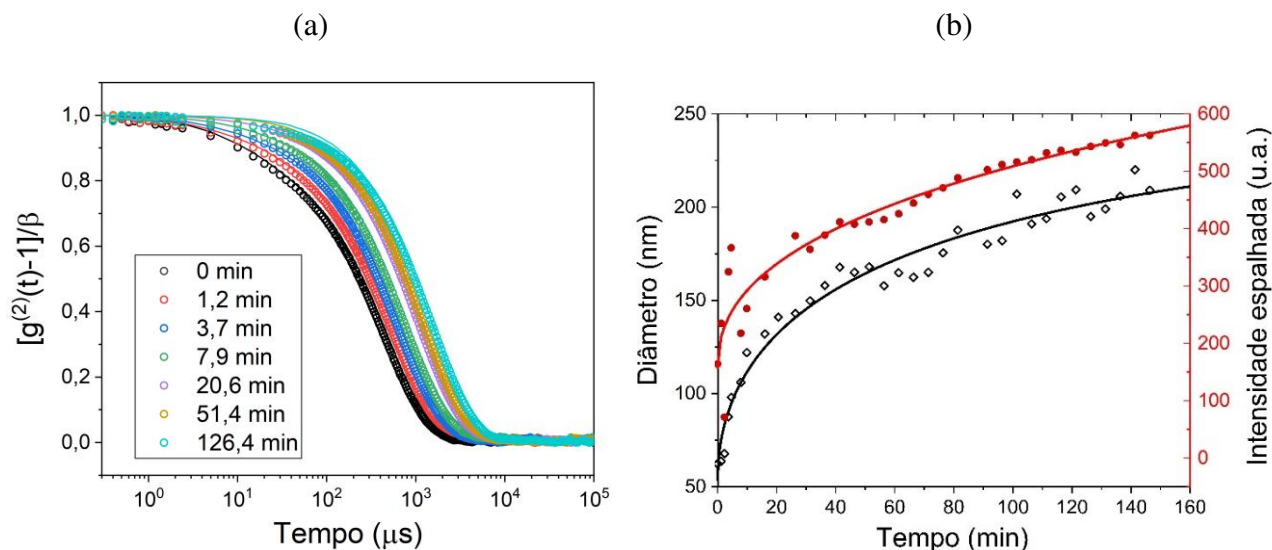


Figura 15. Curvas de correlação da intensidade da luz espalhada normalizadas em função do tempo das NPsAg ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e CIP ($6,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (a). As linhas contínuas mostram o ajuste pelo modelo NNLS. Aumento do diâmetro das NPsAg na presença de CIP em função do tempo (b).

A Figura 15b, apresenta as curvas de correlação NNLS normalizadas, bem ajustadas com os dados experimentais, referentes a um perfil monomodal de tamanhos, isto é, apenas uma população de partículas (a distribuição de tamanhos não é apresentada). Como cada tamanho de partícula contribui para um decaimento exponencial da função, ao passo que cada medida é feita ao longo do tempo, as funções apresentam um deslocamento para a direita indicando tempos maiores de decaimento. Tempos de correlação maiores estão associados a maiores tamanhos de partículas (menores coeficientes de difusão), e vice-versa. Isso demonstra um aumento no tamanho das NPs, haja vista que a partir da função de correlação obtém-se os tempos de correlação que por sua vez, gera informações sobre as distribuições de tamanhos das NPs. Dessa forma, as curvas do gráfico (a) representam a qualidade das medidas e a concordância dos ajustes para se obter os diâmetros dados no gráfico (b).

É possível concluir com os resultados do DLS, que a CIP induz um aumento do diâmetro das NPsAg em função do tempo, demonstrando a ocorrência de agregação delas.

XU *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes para detecção de acetamiprido em amostras de frutas e vegetais por meio da agregação de nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução química com citrato. O mecanismo é

semelhante, isto é, o grupo ciano da molécula de acetamiprido possui grande afinidade com a superfície positiva das nanopartículas de ouro, fazendo com que elas se agreguem, e por sua vez mudando a cor do sistema, dessa forma que atuam os nanosensores.

Diante de tais observações, foi construída uma curva analítica, concentração de CIP em função da absorbância (400 nm), para verificar se existia uma relação entre esses parâmetros (Figura 17b, página 52). Porém, não se observou uma correlação satisfatória entre as variáveis. Concluiu-se que, mesmo os nanosensores mudando de cor na presença das fluoroquinolonas, o método ainda não poderia ser usado para obter informações quantitativas dos fármacos. Novos ensaios foram realizados utilizando-se diferentes agentes estabilizantes que pudessem fornecer dados melhor correlacionados.

3.3. Estudo de estabilização das NPsAg

A estabilização das NPsAg com glutathiona foi avaliada por análise de espalhamento de luz e por absorção molecular UV/Vis. Os resultados obtidos pelo DLS podem ser observados na Figura 16.

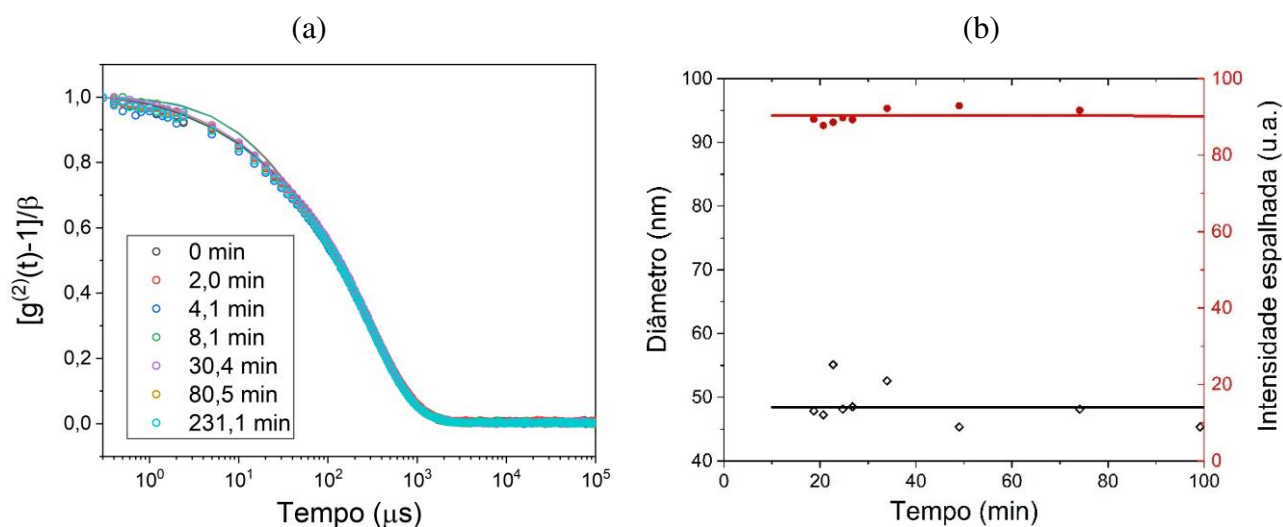


Figura 16. Curvas de correlação da intensidade da luz espalhada normalizadas em função do tempo das NPsAg ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) estabilizadas com GSH ($1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e CIP ($6,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (a). Variação do diâmetro das NPsAg na presença de CIP (b).

É observado na Figura 16b, que não houve aumento do diâmetro medido das NPsAg estabilizadas com GSH na presença de CIP em função do tempo, isto é, não aparenta haver agregação delas, ou pelo menos um retardo na velocidade de agregação

delas. O gráfico (a) não apresentou diferenças significativas nas funções de correlação das medidas, isto é, não houve mudanças nos tempos de correlação, de forma que se pode notar um comportamento bem distinto do observado com as NPsAg puras e a CIP, no item anterior. Essas pequenas flutuações dos pontos no gráfico (b) se deve à sensibilidade do ajuste (NNLS) utilizado para calcular os diâmetros das NPs.

Não obstante, foi observado que o diâmetro médio das NPsAg-GSH é de 48 nm, maior que o tamanho medido das NPsAg puras, que era de 38 nm (descrita nos resultados de DLS no item 3.1, página 43), comprovando assim, que houve aumento do diâmetro mais não houve agregação de NPs. De fato, demonstra que a GSH estabiliza as NPs enquanto forma uma cobertura em torno delas.

Os resultados da estabilização das NPsAg com glutathione por absorção UV/Vis podem ser visualizados nas Figura 17a e b. Ao utilizar as NPsAg estabilizadas com GSH foi constatada uma correlação entre o sinal analítico e a concentração, por apresentar uma curva melhor ajustada (curva preta, referente ao pico de 400 nm da Figura 17a), de comportamento exponencial com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9877. Porém, a curva sem GSH (curva vermelha da Figura 17b, referente ao espectro da Figura 13 da página 46, monitorado em 400 nm) apresenta uma baixa correlação dos pontos.

Este resultado está relacionado a uma estabilização mais expressiva, por se tratar de uma estabilização eletrostérica (estabilização eletrostática e estérica), que dificulta a ligação de uma parcela das FQs na superfície das NPs (Figura 8), enquanto outra parcela se liga às moléculas de GSH aderidas na superfície das NPsAg por meio de interações cátion- π (grupos positivamente carregados da GSH e ligações π dos anéis quinolônicos) (Figura 18 e Figura 19) (MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012). Ao usar a glutathione reduzida como estabilizante, os grupos amida e principalmente tiol (da cisteína), ligam-se às NPs, promovendo uma estabilização estérica, devido ao extenso tamanho da cadeia da molécula, causando uma barreira para aproximação de uma parcela das FQs à superfície das NPs e a aproximação das NPs entre si, diminuindo a sua agregação (ARAGAY; PINO; MERKOÇI, 2012; BALAVANDY et al., 2014; LI; CUI; HAN, 2009; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2017; WANG et al., 2017).

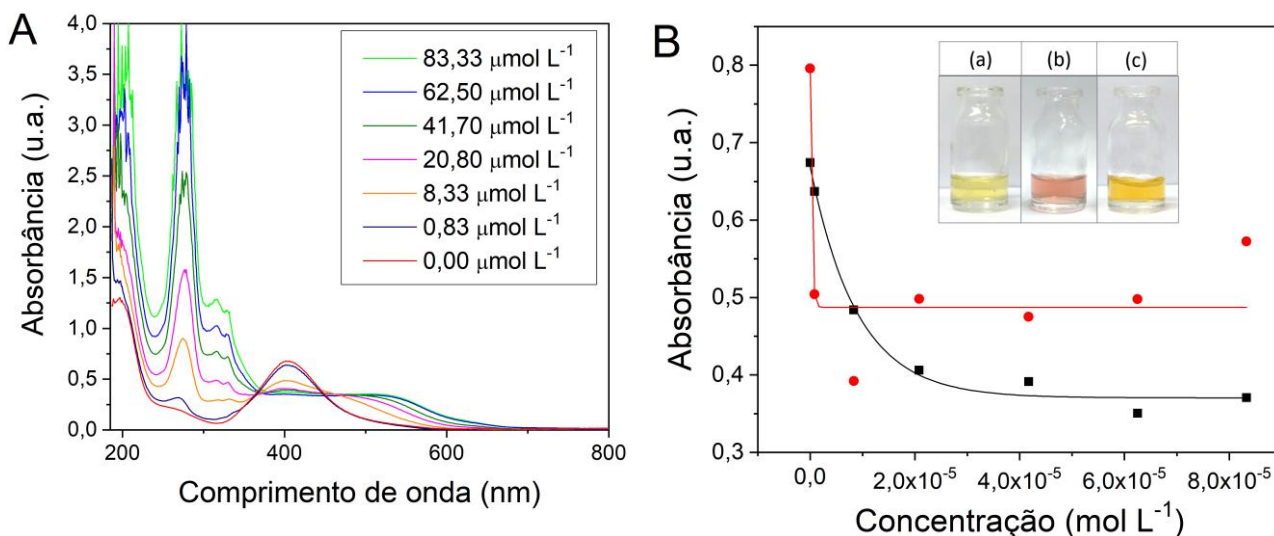


Figura 17: Espectro da ciprofloxacina em diferentes concentrações na presença de GSH (A). Estudo comparativo entre o comportamento das curvas (■) com GSH e (●) sem GSH (b) em 400 nm (B). Inset: Fotografia das nanopartículas de prata (a) com ciprofloxacina (b) e com ciprofloxacina e GSH (c).

Contudo, após a adsorção de GSH nas nanopartículas de prata, as moléculas de GSH ainda têm grupos funcionais livres para interagir com as FQs (Figura 19), causando modificações no confinamento dos elétrons e, conseqüentemente, modificações nas excitações plasmônicas das NPs, com o acoplamento de mais estruturas na superfície das NPsAg (LI; CUI; HAN, 2009). Assim, tem-se um decaimento na absorção em 400 nm (em comparação a intensidade de absorção das NPs puras) (BALAVANDY et al., 2014; LI; CUI; HAN, 2009; MOHAMMADI; KHAYATIAN, 2017; WANG et al., 2017).

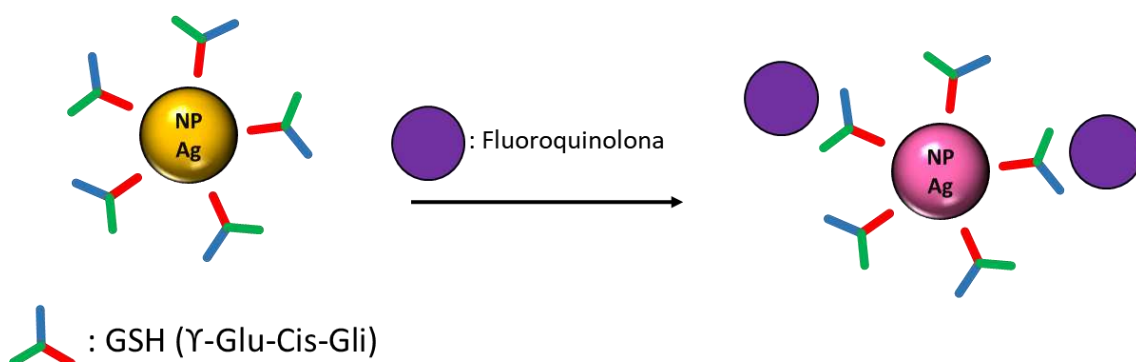


Figura 18. Mecanismo de alteração da excitação de plasmons das nanopartículas estabilizadas pela glutathione induzidas pelas fluoroquinolonas.

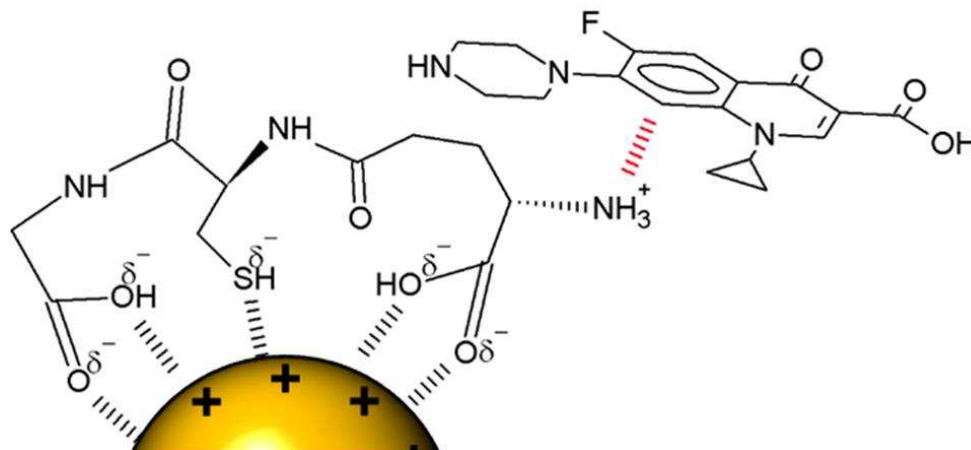


Figura 19. Mecanismo de interação cátion- π entre um grupo positivamente carregado da GSH e o anel aromático da ciprofloxacina.

Vale ressaltar que para o desenvolvimento e validação de um método quantitativo, fez-se necessário estipular uma faixa de concentração mais apropriada para elaboração da curva analítica, o que será discutido nos próximos itens.

3.4. Cinética de reação das NPsAg estabilizadas

Durante a execução dos experimentos, foi observado que todos os ensaios envolvendo diferentes concentrações de FQs pareciam fornecer uma condição limite após um longo tempo de repouso. Nestes casos, a coloração das suspensões mudava de laranja para rosa acinzentado, com e sem GSH. Diante disso, foi necessário verificar se o tempo possui alguma influência na detecção das fluoroquinolonas. A cinética foi avaliada com a CIP mediante o monitoramento da absorvância RPS por espectrofotometria (Figura 20), e o deslocamento de banda de meia altura de absorvância ($\lambda_{ABS/2}$). Esse deslocamento de banda (em torno dos 500 nm) foi medido para cada espectro em função do tempo. Para isso, foram medidos os comprimentos de onda que possuem interseção com absorvância que corresponde à metade ($ABS_{1/2} = 0,27$) do valor do pico máximo nessa região ($ABS_{m\acute{a}x} = 0,45$) (inset da Figura 20)

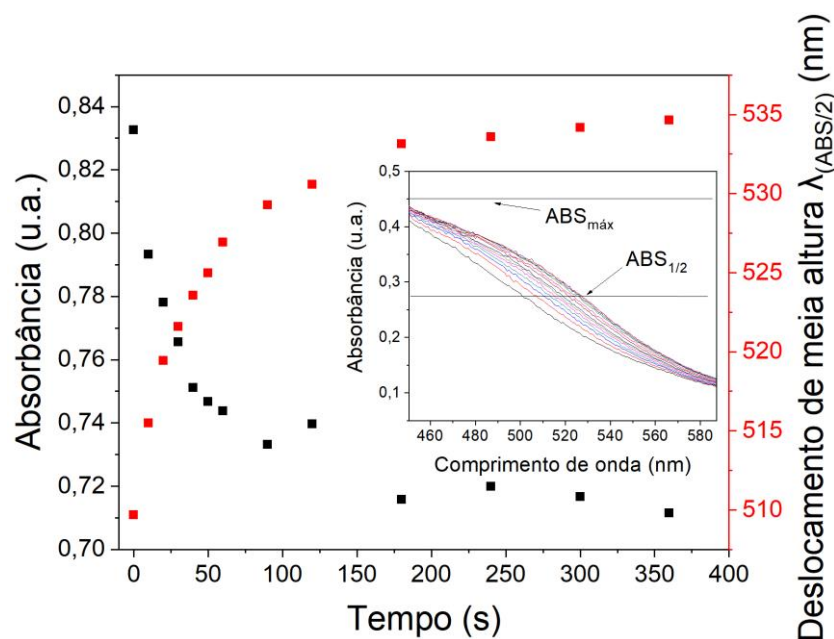


Figura 20. Estudo cinético das NPsAg. Comprimento de onda monitorado em 400 nm (■) e deslocamento de banda de meia altura $\lambda_{\text{ABS}/2}$ (■) em função do tempo. Condições de análise: NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), GSH ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e CIP ($2,78 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Insert mostra como foi medido o $\lambda_{\text{ABS}/2}$.

Pode-se observar na Figura 20, a diminuição de absorbância no comprimento de onda monitorado (400 nm), que está associado à cor amarela da dispersão coloidal de NPsAg (curva preta), enquanto é gerada uma coloração rósea (curva vermelha). A rápida interação das nanopartículas de prata, sinalizada pela intensa diminuição da absorbância no início da curva preta (aumento da absorbância na curva vermelha), foi causada pela diminuição na energia livre de interação das nanopartículas por causa da adsorção das FQs nas NPsAg-GSH. O declínio da curva preta (e a ascensão da curva vermelha), em direção à formação de um estado estacionário após os 175 segundos (condição de equilíbrio), pode ser explicada pela diminuição da taxa de interação devido à menor quantidade de FQs que são adsorvidas. Esse fato pode estar relacionado à diminuição de FQs livres no meio reacional, e/ou pela dificuldade de mais moléculas se aderirem as superfícies das NPsAg-GSH.

Como observado na Figura 21, uma maior concentração de FQs promove declínio mais acentuado nos primeiros 50 min (mudança de cor mais intensa), pela maior disponibilidade de moléculas de FQ, representando de fato uma maior taxa de interação entre as NPsAg e as FQs nesse intervalo inicial da reação, ao comparar duas concentrações diferentes de CIP. Dessa forma, observa-se no gráfico, que uma

concentração menor apresenta uma variação inicial da absorbância em aproximadamente 0,1, enquanto uma concentração maior, apresenta uma maior variação inicial de absorbância, de aproximadamente 0,15.

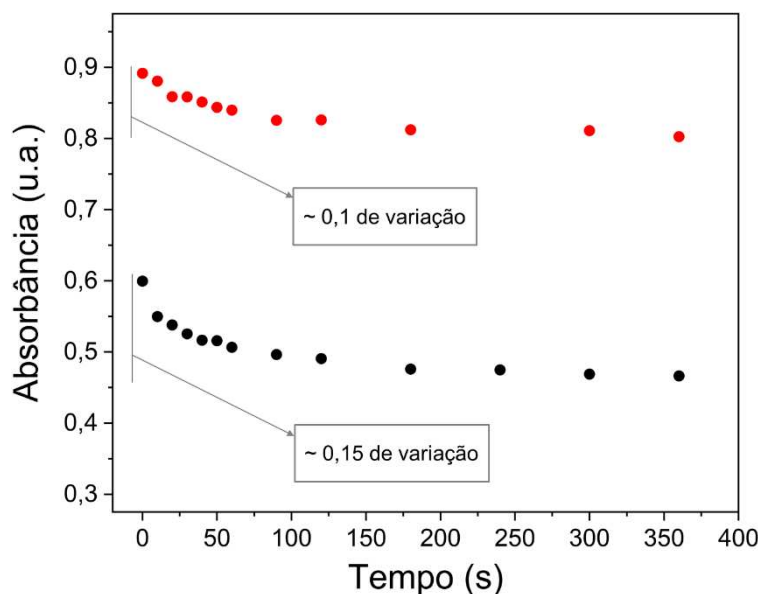


Figura 21. Estudo da interação das NPsAg. Comprimento de onda monitorado 400 nm. Condições de análise: NPsAg ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), GSH ($8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e CIP nas concentrações de (●) $1,94 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (●) $2,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para viabilizar a quantificação das fluoroquinolonas, o tempo da leitura de análise foi estipulado em 20s, proporcionando tempo de reação uniforme e duração adequada para execução experimental das medidas.

Análises semelhantes foram feitas por XU *et al.* (2011), em que os autores também desenvolveram um método colorimétrico baseado na agregação de nanopartículas de ouro para determinação de acetamiprido em frutas e vegetais, obtendo resultados cinéticos semelhantes, também com um decaimento exponencial semelhante ao da Figura 20 e Figura 21, porém com um tempo de agregação mais longo (em que o equilíbrio começa em 50 minutos), enquanto que neste trabalho o equilíbrio se inicia em 175 segundos.

3.5. Validação do método de quantificação de fluoroquinolonas por NPsAg

Tendo em vista que as condições foram otimizadas previamente, deu-se prosseguimento então ao desenvolvimento de um método para detecção e quantificação das fluoroquinolonas em meio aquoso. Esta etapa consistiu na validação do método,

sendo determinados a veracidade, repetitividade, precisão intermediária e limite de quantificação (LQ), conforme os parâmetros determinados pela ANVISA (ANVISA, 2017, 2018). Foram construídas curvas analíticas para as três fluoroquinolonas (CIP, NOR e ENRO) conforme a seguir, na Figura 22:

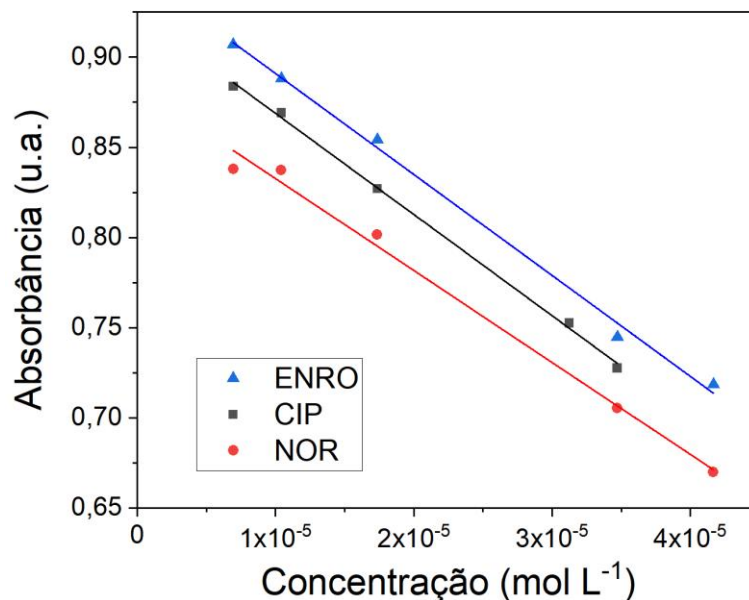


Figura 22. Curvas analíticas monitoradas em 400 nm por EAM-UV/Vis no primeiro dia. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH.

No anexo deste trabalho (página 73), consta as curvas separadas (Figura A1, Figura A2 e Figura A3) com seus respectivos gráficos de resíduos indicando a homocedasticidade e linearidade das curvas, cuja aleatoriedade dos pontos apresenta uma variância não sistemática das medidas, em especial para ciprofloxacina.

A faixa linear de trabalho variou de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para enrofloxacin e norfloxacin, e $6,94 \times 10^{-6}$ a $3,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ciprofloxacina, com coeficientes de determinação de 0,998 a 0,969, exceto para enrofloxacin no terceiro dia (0,833). O método foi muito sensível para as três FQs, no entanto, a ciprofloxacina foi a mais sensível, apresentando maior coeficiente angular, de -5606,08, enquanto a NOR e a ENRO com -5096,66 e -5595,31, respectivamente, para concentrações da ordem de 10^{-5} mol L⁻¹. A Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos pelo método de quantificação de FQs por NPsAg no primeiro dia. Tabela 5 apresenta as equações das curvas analíticas de cada FQs no primeiro dia. A Tabela 6 apresenta os coeficientes de determinação das curvas analíticas das FQs em cada dia.

Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos pelo método de quantificação de FQs por NPsAg no primeiro dia.

Analito	Equação da curva analítica	R ²
CIP	$y = -(5,61 \pm 0,12) 10^3 \times L \text{ mol}^{-1} + (0,9249 \pm 0,0028)$	0,99816
NOR	$y = -(5,10 \pm 0,27) 10^3 \times L \text{ mol}^{-1} + (0,8837 \pm 0,0069)$	0,98918
ENRO	$y = -(5,60 \pm 0,20) 10^3 \times L \text{ mol}^{-1} + (0,9469 \pm 0,0051)$	0,99512

Tabela 6. Coeficientes de determinação para a curva analítica de cada fármaco, nos três diferentes dias, empregando o método de determinação de fluoroquinolonas por NPsAg.

	R ²		
	1º Dia	2º Dia	3º Dia
CIP	0,99816	0,98306	0,97123
NOR	0,98918	0,99627	0,96947
ENRO	0,99512	0,98349	0,83261

Pode-se observar na Tabela 7 uma boa veracidade do método, com recuperações dentro da faixa recomendável, isto é, entre 80 a 120% (ANVISA, 2017), exceto para o segundo nível de ciprofloxacina no terceiro dia (73,8%). O método também apresentou boa repetitividade (precisão intradia) para as três FQs, com coeficiente de variação entre as réplicas inferiores a 20%. A precisão intermediária (interdia) foi realizada nos mesmos níveis de concentração em três dias distintos, em que apresentou um coeficiente de variação de no máximo 15,4%.

Tabela 7. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária para o método de determinação colorimétrica de fluoroquinolonas em água empregando NPsAg.

Fármaco	Concentração (mol L ⁻¹)	1º Dia		2º Dia		3º Dia		Precisão intermediária	
		R*	CV**	R*	CV**	R*	CV**	R*	CV**
Ciprofloxacina	1,99×10 ⁻⁵	98,0	7,98	89,2	17,0	86,5	20,0	91,2	15,3
	2,97×10 ⁻⁵	98,7	5,92	98,2	6,40	73,8	13,6	90,2	15,4
Norfloxacina	1,99×10 ⁻⁵	93,4	13,2	96,5	12,6	110	7,54	100	12,7
	2,97×10 ⁻⁵	89,0	12,3	93,0	6,92	109	5,48	97,0	12,1
Enrofloxaina	1,99×10 ⁻⁵	108	5,16	96,4	16,0	104	11,2	103	11,5
	2,97×10 ⁻⁵	90,0	6,15	83,7	10,4	95,8	13,3	89,9	11,3

*Recuperação; **Coeficiente de Variação. Ambos em %.

Os valores de LD foram de 0,397; 0,437 e 0,398 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto os LQ são de 1,203; 1,323 e 1,205 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina, respectivamente.

A Tabela 8 apresenta informações de validação (linearidade e LD) de alguns métodos desenvolvidos para determinação de FQs em matrizes aquosas, a título de comparação com o método proposto, que apresentou sensibilidade muito semelhante ao descrito na literatura, sendo, porém, uma metodologia mais simples.

Tabela 8: Comparação de outros métodos de determinação de FQs em águas.

Método Analítico	Preparo de amostra	Amostra	Linearidade e faixa analítica	Limite de detecção	Ref.
LC/MS UV 4 tipos de FQs *	SPE cartucho AE/HLB tandem	Águas residuais em estação de tratamento	CIP: $R^2 = 0,72 - 0,82$	CIP: 4 ppt NOR: 7 ppt ENRO: 3 ppt	(RENEW; HUANG, 2004)
LC-MS/MS 3 tipos de FQs*	SPE HLB	Águas residuais e fluviais	CIP $R^2 = 0,9989$ NOR $R^2 = 0,999$ ENRO $R^2 = 0,9992$	CIP: 13,2 ppt NOR: 11,0 ppt ENRO: 6,5 ppt	(SENTA; TERZIĆ; AHEL, 2008)
HPLC/UV 5 tipos de FQs	Extração líquido - líquido	Águas residuais e esgoto perto de hospitais	$R^2 = 0,999$ (0,05 – 40 $\mu\text{g/mL}$)	CIP: 1,5 ppb	(ASHFAQ et al., 2016)
MEKC	SPE HLB/FQ-MIP	Águas superficiais	$R^2 = 0,999$ (5 – 20 $\mu\text{g/mL}$)	1 ppm Para CIP, NOR e ENRO.	(PRUTTHIWANASAN; SUNTORNSUK, 2018)
HPLC/RLS 5 tipos de FQs*	Filtragem com membrana de nylon 0.2 μm	Matrizes aquosas	ENO $R^2 = 0,9933$ OFLX $R^2 = 0,9996$ LMLX $R^2 = 0,9719$ GFLX $R^2 = 0,9985$ SPLX $R^2 = 0,9935$ (0,17 – 25 $\mu\text{g/mL}$)	ENO: 5,1 ppb OFLX: 3,1 ppb LMLX: 4,2 ppb GFLX: 3,8 ppb SPLX: 17,5 ppb	(PAN et al., 2018)
LC-MS/MS (RAM - BSA) 6 tipos de FQs*	Nenhum	Águas superficiais e residuais	CIP $R^2 = 0,998$ ENR $R^2 = 0,992$ GEM $R^2 = 0,990$ MOX $R^2 = 0,994$ NOR $R^2 = 0,995$ OFL $R^2 = 0,993$ (20 – 800 ng/L)	CIP: 10,9 ppt ENR: 5,3 ppt GEM: 31,8 ppt MOX: 11,6 ppt NOR: 10,5 ppt OFL: 7,8 ppt	(DENADAI; CASS, 2015)
Eletroforese Capilar em zona 2 tipos de FQs*	Nenhum	Águas residuais de pecuária suína	CIP $R^2 = 0,996 - 0,995$ ENRO $R^2 = 0,996 - 0,992$ (0,05 – 1 $\mu\text{g/mL}$)	CIP 7 – 23 ppb ENRO 10 – 33 ppb	(DÍAZ-QUIROZ et al., 2018)
NPsAg - GSH	Nenhum	Matrizes aquosas	CIP $R^2 = 0,99816$ NOR $R^2 = 0,98918$ ENRO $R^2 = 0,99512$ (2,3 – 13,8 $\mu\text{g/mL}$)	CIP: 132 ppb NOR: 139 ppb ENRO: 143 ppb	Este trabalho

* Detecção simultânea das FQs analisadas

A seletividade do método também foi avaliada. Sabe-se que inúmeros medicamentos são despejados no meio ambiente e, para esta etapa, foi considerado um grupo de fármacos, que por serem considerados de uso comum e recorrentes, coexistem com as FQs em efluentes, principalmente em efluentes residenciais e hospitalares. O método mostrou ser seletivo frente aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas: amoxicilina e penicilina G; e as cefalosporinas: cefadroxil, cefalexina e ceftriaxona) e cafeína por não ser observada a mudança de cor característica na análise de FQs, como pode ser visto na Figura 23 e nos gráficos da Figura 24.

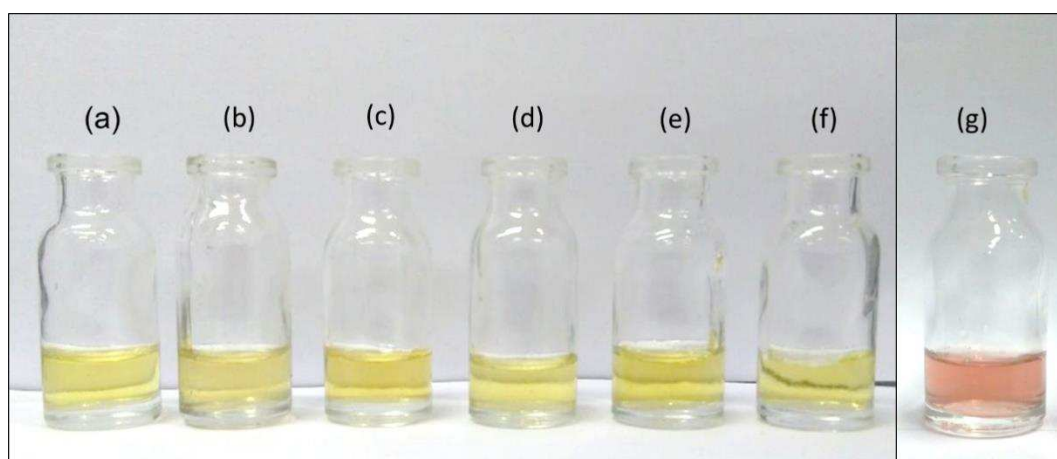


Figura 23. Fotografia das NPsAg com diferentes fármacos para ensaio de seletividade: (a) amoxicilina, (b) cafeína, (c) cefadroxil, (d) cefalexina, (e) ceftriaxona, (f) penicilina G e (g) ciprofloxacina. Condições de análise: $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para fármacos e nanopartículas.

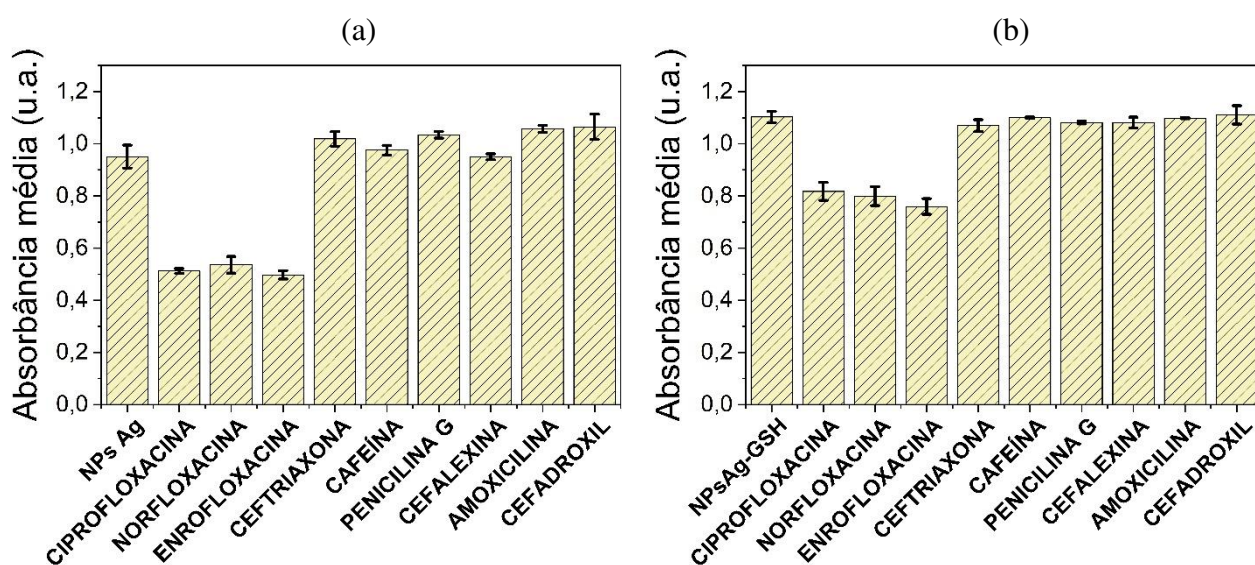


Figura 24. Estudo de seletividade das NPsAg, que mostram as absorbâncias em 400 nm das NPsAg na presença dos fármacos testados ($8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) (n=3). Os valores foram obtidos em torno de 20s, com adição dos fármacos às NPsAg. (a) apenas com NPsAg; (b) NPsAg estabilizadas com GSH.

Em ambos gráficos da Figura 24 foi observado que a absorbância média em 400 nm diminui na presença das FQs, mas não diminui na presença dos outros fármacos, garantindo assim a seletividade do método para determinação de FQs.

Na Figura 23 é possível observar visualmente a mudança de cor para as FQs (neste caso a CIP), mas não para os demais fármacos. Como discutido na seção 3.2 (página 45), na presença de FQs, a suspensão de NPsAg apresenta uma coloração avermelhada, com o surgimento de uma banda em 520 nm. Os resultados mostrados na Figura 24a são decorrentes dos ensaios mostrados nas fotografias da Figura 23.

3.6. Aplicação do método em uma amostra autêntica

Diante do fato de que já foram reportados trabalhos em que FQs foram detectadas em água tratada, e a necessidade de métodos simples e rápidos de quantificação de FQs em água, avaliou-se o método em uma amostra autêntica de água para verificar a validade do método. Sabe-se que a presença de íons como sódio, potássio, cálcio, ferro, entre outros, interferem na estabilização eletrostática das nanopartículas, podendo promover um efeito de matriz na análise. Assim, procurou-se minimizar esse efeito realizando uma curva analítica com superposição de matriz, como pode ser visto na Figura 25a. Os espectros das amostras usadas para construção da curva são mostrados na Figura 25b.

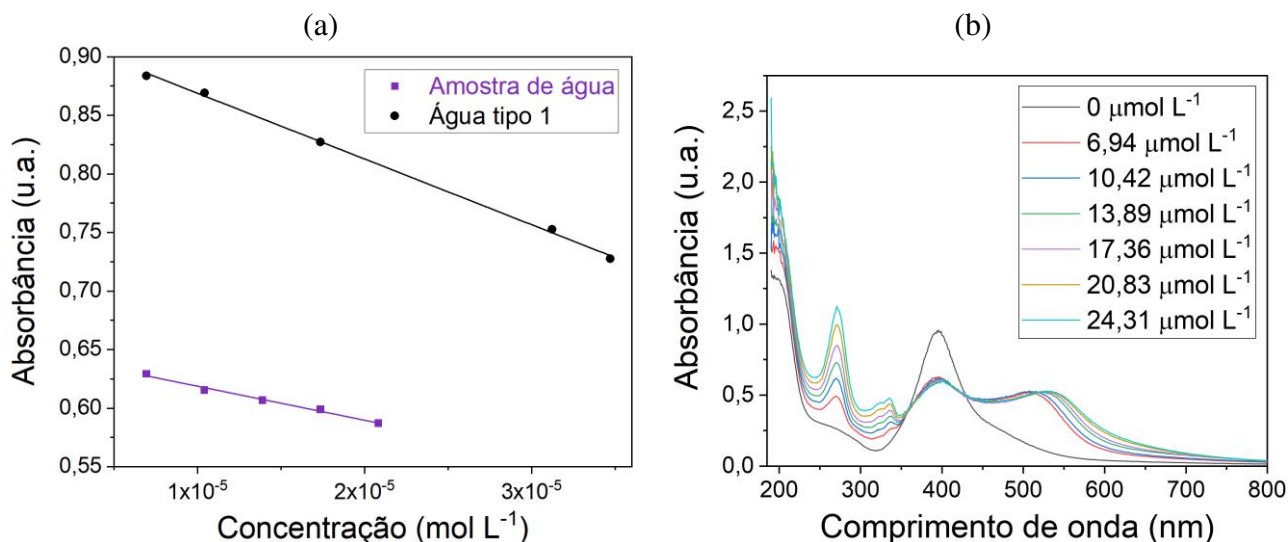


Figura 25. Curvas analíticas da ciprofloxacina em água tipo 1 (preto) e amostra de água (roxo) com superposição de matriz (a). Espectros das amostras usadas em “a” (b). Teor das NPsAg $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; [GSH] = $5,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inset: Gráfico de resíduos.

Os parâmetros analíticos da curva analítica da Figura 25a são mostrados na Tabela 9. Na Figura A4 do anexo deste trabalho (página 74), encontra-se a curva da ciprofloxacina com a amostra de água e o gráfico de resíduos indicando a homocedasticidade e linearidade da curva, cuja aleatoriedade dos pontos apresenta uma variância não sistemática das medidas. A faixa linear de trabalho variou de $6,94 \times 10^{-6}$ a $2,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,986. O método permanece muito sensível, embora a faixa linear de trabalho seja mais estreita, do que com água tipo I, como é possível ver na Figura 25.

Tabela 9. Parâmetros analíticos obtidos pelo método de quantificação de CIP por NPsAg em uma amostra autêntica de água.

Analito	Equação da curva analítica	R ²
CIP	$y = -(2,90 \pm 0,17) 10^3 \times L \text{ mol}^{-1} + (0,6478 \pm 0,0025)$	0.98605

O método também foi validado, utilizando os mesmos procedimentos experimentais do item anterior. Foram determinados a veracidade, repetitividade, e limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os resultados apresentaram uma boa exatidão, com recuperação dentro da faixa recomendável, isto é, entre 80 a 120% (ANVISA, 2017). Também apresentou boa repetitividade, com de coeficiente de variação inferiores a 20%. Os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Veracidade e repetitividade para o método de determinação colorimétrica de fluoroquinolonas em água tratada empregando NPsAg.

Concentração (mol L ⁻¹)	Recuperação média (%)	Coefficiente de Variação (%)
1,04×10 ⁻⁵	106	11,05
1,74×10 ⁻⁵	98	6,81

O limite de detecção foi de 0,767 µmol L⁻¹, enquanto o limite de quantificação foi de 2,323 µmol L⁻¹, valores maiores que os encontrados no item anterior (com água tipo I), demonstrando que houve um efeito de matriz que diminuiu a sensibilidade do método (como é possível também observar pela inclinação da reta da Figura 25). Isso pode ser explicado, devido ao fato de que os íons presentes na água podem aumentar a força iônica do meio reacional. Esse fato altera a característica dielétrica/polarizante do meio reacional, alterando a RPLS das NPsAg, simultaneamente ao efeito causado pelas FQs. Esse fato foi comprovado pela análise de condutância de ambas as amostras (água tipo I e amostra autêntica). Foi observado uma ligeira salinidade da amostra de água que apresentou valor de 85 µS, em relação a 2 µS da água tipo I, usada nos ensaios anteriores (ambas em temperatura 22,4°C ± 0,5°C). Esse evento é a causa da diminuição dos limites de detecção e quantificação do método.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível desenvolver um método quantitativo para fluoroquinolonas em matrizes aquosas empregando nanopartículas de prata estabilizadas com glutathione. O método demonstrou ser sensível, seletivo, simples, rápido e fácil de ser executado, ademais, dispensa o preparo de amostra e uso de equipamentos sofisticados e complexos. Também se trata de um método quimicamente seguro, já que a água é o solvente utilizado na síntese das nanopartículas e a glutathione, um tripeptídeo presente nos organismos vivos, foi usada como estabilizante das nanopartículas. E sobretudo, o mais importante, o método foi validado apresentando bons resultados para linearidade, precisão, veracidade, limites de detecção e quantificação e seletividade.

5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para trabalhos futuros, propõe-se:

- Substituir o borohidreto de sódio por outros agentes redutores que colaborem com os princípios da química verde;
- Investigar o tipo de interações que as fluoroquinolonas e a glutathione possuem com a superfície das NPsAg através de análises de infravermelho ou raman.
- Investigar diferentes estabilizantes, visando aprimorar a funcionalização das nanopartículas, para favorecer a análise em matrizes mais complexas como urina, sangue, leite etc.
- Executar uma análise multivariada dos parâmetros analisados com o método; e determinação simultânea e multirresíduo das FQs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 2013.
- ADRIAENSSENS, N. et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): Outpatient quinolone use in Europe (1997-2009). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. SUPPL. 6, p. 47–56, 2011.
- AHMAD, M. BIN et al. Green synthesis and characterization of silver/chitosan/polyethylene glycol nanocomposites without any reducing agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 8, p. 4872–4884, 2011.
- ALBINI, A.; MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **Chemical Society Reviews**, v. 32, n. 4, p. 238–250, 2003.
- AMJADI, M.; FARZAMPOUR, L. Fluorescence quenching of fluoroquinolones by gold nanoparticles with different sizes and its analytical application. **Journal of Luminescence**, v. 145, p. 263–268, 2014.
- ANVISA. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**.BRASILDiário Oficial da União, 141, , 2017. Disponível em: <http://www.impresanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>
- ANVISA. Guia para tratamento estatístico da validação analítica. **Guia Nº 10/2017 - Versão 1**, p. 19, 2018.
- ARAGAY, G.; PINO, F.; MERKOÇI, A. **Nanomaterials for sensing and destroying pesticides****Chemical Reviews**, 2012.
- ASHFAQ, M. et al. Occurrence and ecological risk assessment of fluoroquinolone antibiotics in hospital waste of Lahore, Pakistan. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 16–22, 2016.
- ASSIS, L. M. DE et al. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.
- BABIĆ, S. et al. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 1185–1194, 2010.
- BALAVANDY, S. K. et al. Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. suppl 3, p. 17–24, 2006.

- BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163–171, 2000.
- BENSON, O. Assembly of hybrid photonic architectures from nanophotonic constituents. **Nature**, v. 480, p. 193, 8 dez. 2011.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BRASIL. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários)**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf/view>>.
- BRASIL. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf/@@download/file/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf>>.
- BRASIL. **DOQ-CGCRE 008. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Revisão 5**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- BROWN, W. **Dynamic light scattering: the method and some applications**. [s.l.] Clarendon Press, 1993.
- CARREÑO, N. L. V. et al. SÍNTESE CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS E MAGNÉTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE Ni DISPERSAS EM MATRIZ MESOPOROSA DE SiO₂. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 935–942, 2002.
- CASTRIGNANÒ, ERIKA; KANNAN ANDREW M; FEIL, E. J. B. K.-H. Enantioselective fractionation of fluoroquinolones in the aqueous environment using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2018.
- CUPRYS, A. et al. Fluoroquinolones metal complexation and its environmental impacts. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 376, p. 46–61, 2018.
- DANIEL, M. C. M.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293–346, 2004.
- DEGHAN MONFARED, A. et al. **Adsorption of silica nanoparticles onto calcite: Equilibrium, kinetic, thermodynamic and DLVO analysis**. [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 281
- DENADAI, M.; CASS, Q. B. Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with

- direct injection: A green approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1418, p. 177–184, 2015.
- DERAYEA, S. M. et al. Application of surface plasmon resonance of citrate capped silver nanoparticles for the selective determination of some fluoroquinolone drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 2, p. 016–024, 2017.
- DÍAZ-QUIROZ, C. A. et al. Simultaneous quantification of antibiotics in wastewater from pig farms by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, n. December 2017, p. 386–393, 2018.
- FERNÁNDEZ-LODEIRO, J. et al. New-coated fluorescent silver nanoparticles with a fluorescein thiol ester derivative: Fluorescent enhancement upon interaction with heavy metal ions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 3, 2014.
- GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS**, v. 44, p. 1–20, 2011a.
- GARCIA, M. V. D. Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. **Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, p. 77, 2011b.
- GERBER, M. D. et al. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. **Science of The Total Environment**, v. 592, p. 86–90, 2017.
- GRIGORCHUK, N. I. Resonance plasmon linewidth oscillations in spheroidal metallic nanoparticle embedded in a dielectric matrix. v. V, 2018.
- GUO, H. et al. Kinetics and transformation pathways on oxidation of fluoroquinolones with thermally activated persulfate. **Chemical Engineering Journal**, v. 292, p. 82–91, 2016.
- HE, Z. et al. Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, n. September, p. 781–789, 2016.
- HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, p. 5–17, 2002.
- HENGLEIN, A.; GIERSIG, M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9533–9539, 1999.
- HOENER, B. S. et al. Plasmonic Sensing and Control of Single-Nanoparticle Electrochemistry. **Chem**, v. 4, n. 7, p. 1560–1585, 2018.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**.

6. ed. [s.l.: s.n.].

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. In: HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. (Eds.). . **Microwaves in Nanoparticle Synthesis**. 1. ed. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2016. p. 1–18.

HOTZA, D.; KERAMIK, A. T. ARTIGO REVISÃO : Colagem de Folhas Cerâmicas. **Cerâmica**, v. 43, p. 157–164, 1997.

HOULTON, A. C. Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization. In: THOMAS, S.; THOMAS, R.; MISHRA, R. K. (Eds.). . **Transactions. Ophthalmological Society of the United Kingdom**. Johannesburg: Elsevier Inc., 1956. v. 76p. 519–535.

HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2627–2631, 2004.

HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Preparation and characterization of metal – chitosan nanocomposites. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 39, p. 31–37, 2004.

HUANG, X. et al. Silver nanoclusters capped silica nanoparticles as a ratiometric photoluminescence nanosensor for the selective detection of I–and S2–. **Analytica Chimica Acta**, v. 988, p. 74–80, 2017.

IRANIFAM, M. Chemiluminescence reactions enhanced by silver nanoparticles and silver alloy nanoparticles: Applications in analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 126–142, 2016.

JACKSON, A.; MOAKES, S. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films. **Annu. Rev.Phys. Chem.**, v. 51, p. 41–63, 2000.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, n. 22, p. 6782–6786, 2001a.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 7, p. 2313–2322, 2001b.

KAMAGATE, M. et al. Use of laterite as a sustainable catalyst for removal of fluoroquinolone antibiotics from contaminated water. **Chemosphere**, v. 195, p. 847–853, 2018.

KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.

KRUTYAKOV, Y. A. et al. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. **Russian Chemical Reviews**, v. 77, n. 3, p. 233–257, 2008.

- LALIWALA, S. K. et al. Citrate-modified silver nanoparticles as a colorimetric probe for simultaneous detection of four triptan-family drugs. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 197, p. 254–263, 2014.
- LI, H. et al. Highly sensitive and selective tryptophan colorimetric sensor based on 4,4-bipyridine-functionalized silver nanoparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 194–199, 2010.
- LI, H.; CUI, Z.; HAN, C. Glutathione-stabilized silver nanoparticles as colorimetric sensor for Ni²⁺-ion. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 143, n. 1, p. 87–92, 2009.
- LI, Y. et al. Anti-aggregation of gold nanoparticle-based colorimetric sensor for glutathione with excellent selectivity and sensitivity. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 196–200, 2011.
- LIN, A. Y. C.; YU, T. H.; LIN, C. F. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 131–141, 2008.
- LIU, S.; LU, F.; ZHU, J. J. Highly fluorescent Ag nanoclusters: Microwave-assisted green synthesis and Cr³⁺-sensing. **Chemical Communications**, v. 47, n. 9, p. 2661–2663, 2011.
- LLOR VILÀ, C.; MAYER PUJADAS, M. A.; COTS YAGO, J. M. Papel de las nuevas fluoroquinolonas en las infecciones respiratorias en atención primaria. **Atención Primaria**, v. 25, n. 7, p. 512–517, 2000.
- MAGALHÃES, A.; WERNECK, C. **Nas farmácias, venda de remédios subiu 42% em cinco anos**. Disponível em: <<https://www.interfarma.org.br/noticias/1152>>. Acesso em: 16 jul. 2018.
- MARTÍNEZ-CARBALLO, E. et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v. 148, n. 2, p. 570–579, 2007.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MARZA, L.; M, L. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles Luis. **Langmir**, n. 22, p. 32–41, 2006.
- MELO, M. A. et al. Preparação de nanoparticulas de prata e ouro: um método simples para a introdução de nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.
- MIKELONIS, A. M.; YOUN, S.; LAWLER, D. F. DLVO Approximation Methods for Predicting the Attachment of Silver Nanoparticles to Ceramic Membranes. **Langmuir**, v. 32, n. 7, p. 1723–1731, 2016.

- MOHAMMADI, S.; KHAYATIAN, G. Colorimetric detection of biothiols based on aggregation of chitosan-stabilized silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 27–34, 2017.
- MOROZ, A. Electron Mean Free Path in a Spherical Shell Geometry. n. Figure 1, p. 10641–10652, 2008.
- MURPHY, C. J.; JANA, N. R. Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. **Advanced Materials**, v. 14, n. 1, p. 80–82, 2002.
- NETTO-FERREIRA, J. C. Catalytic Reactions Employing the Plasmon Effect of Supported Metal Nanoparticles. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 165–217, 2015.
- OLIVEIRA, M. M. et al. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, n. 2, p. 429–435, 2005.
- PAN, Z. et al. Simultaneous determination of five fluoroquinolones by the selective high performance liquid chromatography associating with sensitive resonance light scattering and mechanism study. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 71–79, 2018.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. OS NANOMATERIAIS E A QUESTÃO AMBIENTAL. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.
- PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy**. [s.l.] Springer US, 2013.
- PÉREZ-JUSTE, J. et al. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 17–18 SPEC. ISS., p. 1870–1901, 2005.
- PRUTTHIWANASAN, B.; SUNTORNSUK, L. Improved resolution of fluoroquinolones using cetyltrimethyl ammonium bromide–micellar electrokinetic chromatography and its application to residue analysis in surface water. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, n. April, p. 306–312, 2018.
- QI, W. H.; WANG, M. P. Size and shape dependent melting temperature of metallic nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 88, n. 2–3, p. 280–284, 2004.
- QI, W. H.; WANG, M. P.; XU, G. Y. The particle size dependence of cohesive energy of metallic nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 372, n. 5–6, p. 632–634, 2003.
- RAGHUWANSHI, V. S. et al. Cationic polyacrylamide induced nanoparticles assembly in a cellulose nanofiber network. **Journal of Colloid and Interface**

Science, v. 529, p. 180–186, 2018.

RAJAMANIKANDAN, R.; ILANCHELIAN, M. Simple and visual approach for highly selective biosensing of vitamin B1 based on glutathione coated silver nanoparticles as a colorimetric probe. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 244, p. 380–386, 2017.

RENEW, J. E.; HUANG, C. H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, n. 1–2, p. 113–121, 2004.

REVEST, M.; TATTEVIN, P. Fluoroquinolonas. **EMC - Tratado de Medicina**, v. 18, n. 14, p. 1–7, 2014.

RIAZ, L. et al. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil. **Chemosphere**, v. 191, p. 704–720, 2018.

RODRIGUES-SILVA, C. et al. OCORRÊNCIA E DEGRADAÇÃO DE QUINOLONAS POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS. v. 37, n. 5, p. 868–885, 2014.

ROHIT, J. V.; KAILASA, S. K. Cyclen dithiocarbamate-functionalized silver nanoparticles as a probe for colorimetric sensing of thiram and paraquat pesticides via host–guest chemistry. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 11, 2014.

SAKHO, E. H. M. et al. Scattering Methods and their Application in Colloid and Interface Science. In: **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**. Graz: [s.n.]. p. 37–49.

SAYIN, K. et al. Computational study of some fluoroquinolones: Structural, spectral and docking investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 172–181, 2018.

SENTA, I.; TERZIĆ, S.; AHEL, M. Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS. **Chromatographia**, v. 68, n. 9–10, p. 747–758, 2008.

SHAMELI, K. et al. Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 271–284, 2011.

SIM, W. J. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 179–186, 2011.

SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **J. Chem. Educ.**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

SOUZA, K. C. DE; MOHALLEM, N. D. S.; SOUSA, E. M. B. DE.

- NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS: POTENCIALIDADES DE APLICAÇÕES EM BIOMEDICINA. *Quimica Nova*, v. 34, n. 10, p. 1476–1484, 2011.
- SPELTINI, A. et al. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: Sample preparation and determination. *Journal of Separation Science*, v. 33, n. 8, p. 1115–1131, 2010.
- STAMPLECOSKIE, K. G.; SCAIANO, J. C. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 132, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1825–1827, 2010.
- SUTARIYA, P. G. et al. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity, using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, v. 147, p. 590–597, 2016.
- UEHARA, N.; OOKUBO, K.; SHIMIZU, T. Colorimetric assay of glutathione based on the spontaneous disassembly of aggregated gold nanocomposites conjugated with water-soluble polymer. *Langmuir*, v. 26, n. 9, p. 6818–6825, 2010.
- UIVAROSI, V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: An update. *Molecules*, v. 18, n. 9, p. 11153–11197, 2013.
- VAN DOORSLAER, X. et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Science of the Total Environment*, v. 500–501, p. 250–269, 2014.
- VILELA, D.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 751, p. 24–43, 2012.
- WAKUDA, D.; HATAMURA, M.; SUGANUMA, K. Novel method for room temperature sintering of Ag nanoparticle paste in air. *Chemical Physics Letters*, v. 441, n. 4–6, p. 305–308, 2007.
- WALRAVEN, N.; LAANE, R. W. P. M. Assessing the Discharge of Pharmaceuticals Along the Dutch Coast of the North Sea. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 199, p. 1–18, 2009.
- WANG, C. et al. Fluorescent silver nanoclusters as effective probes for highly selective detection of mercury(II) at parts-per-billion levels. *Chemistry - An Asian Journal*, v. 7, n. 7, p. 1652–1656, 2012a.
- WANG, C. et al. Fluorescent Silver Nanoclusters as Effective Probes for Highly Selective Detection of Mercury(II) at Parts-per-Billion Levels. *Chemical Reviews*, v. 112, n. 10, p. 5317–5338, 2012b.
- WANG, C. et al. Stable Ag nanoclusters-based nano-sensors: Rapid sonochemical synthesis and detecting Pb²⁺ in living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*,

- v. 238, p. 1136–1143, 2017.
- WANG, D. et al. Plasmonic-based nanomaterials for environmental remediation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 237, n. December 2017, p. 721–741, 2018a.
- WANG, D. et al. Copper sulfide nanoplates as nanosensors for fast, sensitive and selective detection of DNA. **Talanta**, v. 178, p. 905–909, 2018b.
- WANG, H.; XUE, L.; JIANG, H. Ratiometric fluorescent sensor for silver ion and its resultant complex for iodide anion in aqueous solution. **Organic Letters**, v. 13, n. 15, p. 3844–3847, 2011.
- XIONG, D.; LI, H. Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water. **Nanotechnology**, v. 19, n. 46, 2008.
- XU, Q. et al. Determination of acetamiprid by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 3–4, p. 323–329, 2011.
- YIN, S. N. et al. Novel metal nanoparticle-enhanced fluorescence for determination of trace amounts of fluoroquinolone in aqueous solutions. **Talanta**, v. 174, n. May, p. 14–20, 2017.
- ZANCHETTA, P. G.; PENA, A.; GONÇALVES, R. F. Desenvolvimento e validação de método para quantificação simultânea de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina em urina humana. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 2, p. 307–314, 2015.
- ZHANG, L.; WANG, E. **Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging** Nano Today Elsevier Ltd, , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>>
- ZHANG, X. X. et al. Degradation of ciprofloxacin in aqueous bismuth oxybromide (BiOBr) suspensions under visible light irradiation: A direct hole oxidation pathway. **Chemical Engineering Journal**, v. 274, p. 290–297, 2015.
- ZHANG, Z. et al. Plasmonic colorimetric sensors based on etching and growth of noble metal nanoparticles: Strategies and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 114, p. 52–65, 2018.
- ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.
- ZHAO, X. et al. A ratiometric fluorescent nanosensor for the detection of silver ions using graphene quantum dots. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, 2017.

7. ANEXOS

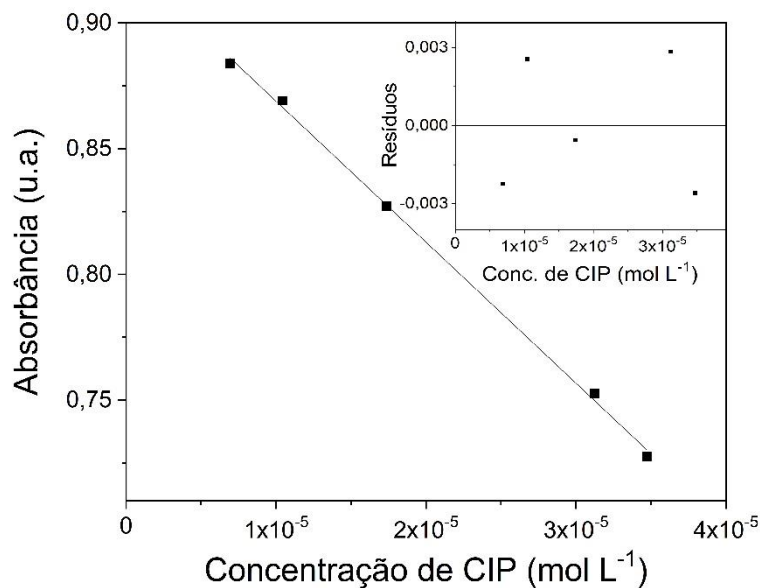


Figura A1. Curva analítica do primeiro dia da ciprofloxacina na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $3,47 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.

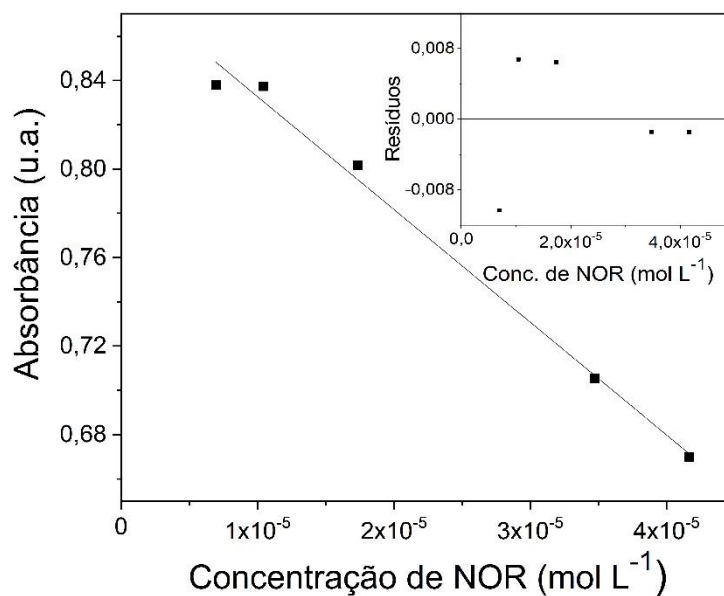


Figura A2. Curva analítica do primeiro dia da Norfloxacin na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.

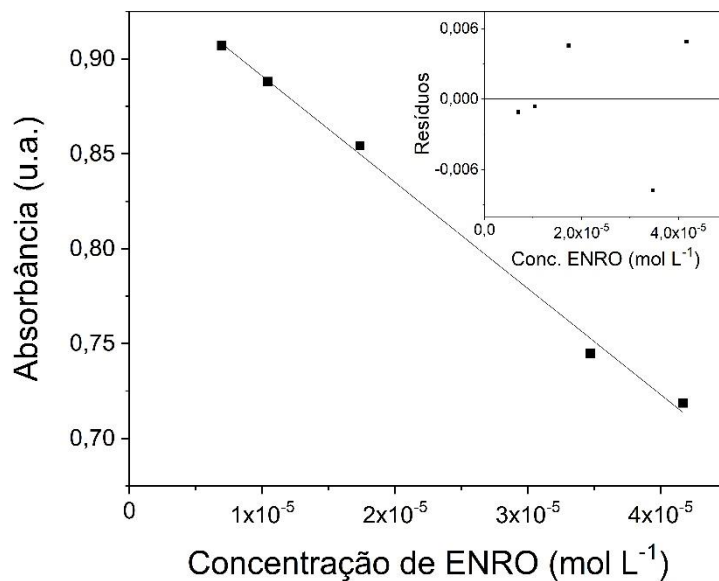


Figura A3. Curva analítica do primeiro dia da Enrofloxacin na faixa de $6,94 \times 10^{-6}$ a $4,17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com comprimento de onda monitorado em 400 nm no EAM-UV/Vis. Condições de análise: $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dispersão coloidal de NPsAg e $5,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ GSH. Insert: Gráfico de resíduos.

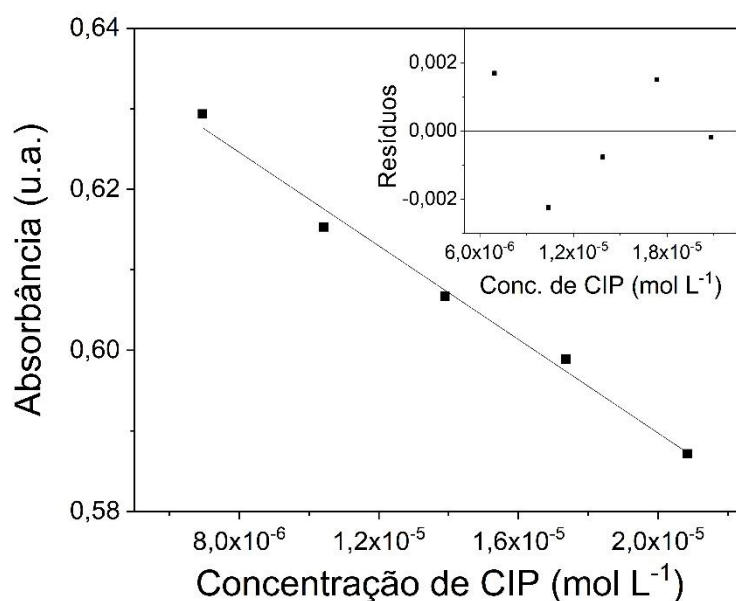


Figura A4. Curva analítica com superposição de matriz (água tratada) para CIP. Teor das NPsAg $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; [GSH] = $5,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Insert: Gráfico de resíduos.