



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



**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS  
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE  
CETOCONAZOL E TBHQ EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL,  
ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICOS**

**CÁSSIA CANAZA FONSECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito à obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

615 Fonseca, Cássia Canaza.  
F676d Desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de Cetoconazol e TBHQ em amostras de interesse ambiental, alimentício e farmacêuticos / Cássia Canaza Fonseca. – Dourados, MS : UFGD, 2013. 60 f.

Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira.  
Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

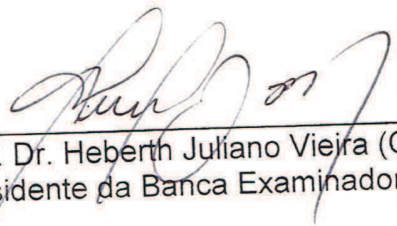
1. Fármaco – Química. 2. Cetoconazol. 2. I. Título.

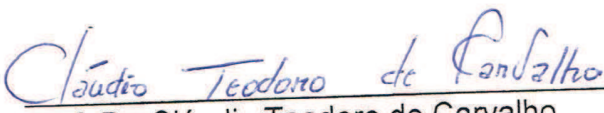


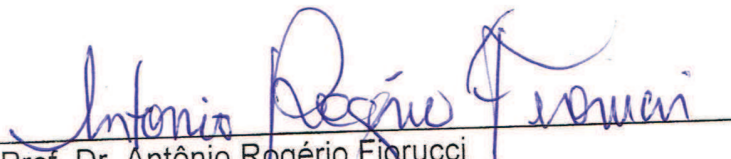
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

### Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para determinação de cetoconazol e TBHQ em amostras de interesse ambiental, alimentício e farmacêuticos", de autoria de Cássia Canaza Fonseca, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira (Orientador-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Carvalho  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio Rogério Fiorucci  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 27 de março de 2013

*Dedico este trabalho primeiramente a DEUS por ter me dado a vida, aos meus pais Enéias da Silva Fonseca e Ivanete Canaza Lima Fonseca e ao meu irmão, Jônatas Canaza Fonseca que me apoiaram em todos os momentos para seguir adiante.*

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar agradeço a Deus, por nunca ter me abandonado em todos os desertos que atravesssei. Mesmo quando não somos fiéis, Ele permanece fiel.*

*Agradeço ao meu pai Enéias e a minha mãe Ivanele por ter me proporcionado tudo que precisei, e pelo grandioso amor, afeto, carinho que me dão e que tem comigo sempre, a cada momento da minha vida e pela confiança que puseram em mim e acreditar que eu seria capaz de vencer. Por apesar de todas as dificuldades, não pensaram em outra hipótese a não se a de me proporcionar à opção de estudo. Meu eterno agradecimento. E ao meu irmão Jonatas que amo muito.*

*A meus avós Jandira e Emanuel, e em especial aos meus avós Cícero e Dorvalina (in memoriam) pela admiração que sempre tive e pelo exemplo de pessoa que jamais será esquecido.*

*Ao meu orientador professor Dr. Heberth Juliano Vieira, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo incentivo à pesquisa e ao aprendizado, e não só pelo acompanhamento na elaboração do meu trabalho, mas pela grande admiração que tenho por ele.*

*Ào corpo docente da UFGD pelos ensinamentos transmitidos que levarei por toda a vida.*

*A secretária da pós-graduação Cláudia pela atenção nesses anos todos.*

*Ào programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização desta pesquisa e elaboração do presente trabalho. À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.*

*Àos meus colegas do laboratório que convivi durante esses anos pela companhia, ajuda e descontração: Geny, Herbert Lee, Jéssica, Vanessa Perônico, Keila, Jader, Jonatan, Greicieli, Marcia, Karoline.*

*Costumo dizer que quem tem amigos, nunca está só. Felizmente, estou longe de ser uma pessoa sozinha. Não caberia nesse espaço, caso fosse citar um a um os nomes de todos os que me ajudaram nesse percurso. Portanto a todos meus amigos que confiaram em mim, sintam-se agradecidos.*

*Senhor agradeço a Ti pelo fim de mais essa etapa.*

*Cássia Canaza Fonseca*

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS.....  | vi        |
| LISTA DE TABELAS.....  | viii      |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....   | ix        |
| RESUMO.....  | vi        |
| ABSTRACT .....   | vii       |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 IMPACTOS DOS FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO .....   | 2         |
| 1.2 CETOCONAZOL .....  | 4         |
| 1.2.1 Aspectos Gerais .....  | 4         |
| 1.2.2 Mecanismo de ação e formas farmacêuticas .....   | 6         |
| 1.2.3 Alguns métodos para determinação de cetoconazol .....  | 7         |
| 1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ANTIOXIDANTES .....  | 9         |
| 1.4 TERC-BUTIL-HIDROQUINONA .....  | 11        |
| 1.4.1 ASPECTOS GERAIS.....   | 11        |
| 1.4.2 Característica e mecanismo de ação.....  | 12        |
| 1.4.3 Metodologia para determinação de TBHQ.....   | 13        |
| 1.5 SURFACTANTES.....  | 17        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS.....  | 21        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 21        |
| <b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1 EQUIPAMENTOS .....   | 23        |
| 3.2 Reagentes e soluções.....  | 23        |
| 3.3 Amostras.....  | 24        |
| 3.4 Procedimentos experimentais.....   | 25        |
| 3.4.1 Obtenção do espectro de fluorescência para determinação de Cetoconazol e TBHQ.....                                       | 25        |
| 3.4.2 Preparo das amostras .....   | 25        |
| 3.4.3 Medidas espectrofotométricas .....   | 26        |
| 3.5 Procedimento para a validação do método proposto.....  | 28        |
| 3.5.1 Determinação da linearidade .....  | 28        |
| 3.5.2 Estudo de recuperação .....  | 28        |
| 3.5.3 Preparação do produto de degradação ácida e de oxidação do cetoconazol .....   | 28        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>30</b> |
| 4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL EM ÁGUA DE RIO E PRODUTOS FARMACÊUTICOS ..... | 31        |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>4.1.1</b> | <b>Estudo dos efeitos dos parâmetros químicos sobre o sinal de emissão</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b>Parâmetros de confiabilidade analítica</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.1.3</b> | <b>Efeito dos interferentes produzidos pela hidrólise ácida e oxidação do cetoconazol sobre a intensidade de emissão</b>                                   | <b>37</b> |
| <b>4.1.4</b> | <b>Estudo de recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas e amostras de água de rio empregando o procedimento proposto</b>                      | <b>38</b> |
| <b>4.1.5</b> | <b>Aplicação</b>   | <b>40</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE TERC-BUTIL-HIDROQUINONA (TBHQ) EM AMOSTRAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO</b> | <b>41</b> |
| <b>4.2.1</b> | <b>Definição do comprimento de onda de excitação (<math>\lambda_{ex}</math>) utilizando matriz de excitação-emissão (EEM)</b>                              | <b>42</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Planejamento fatorial</b>   | <b>44</b> |
| <b>4.2.3</b> | <b>Estudo da concentração do Brij-35 e pH</b>  | <b>48</b> |
| <b>4.2.4</b> | <b>Parâmetros de confiabilidade analítica</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.</b>    | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>54</b> |
| <b>6.</b>    | <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>56</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química do cetoconazol.....  | 4  |
| Figura 2 - Equilíbrio químico do cetoconazol.....   | 5  |
| Figura 3 - Distribuição das espécies do cetoconazol em função do pH.....  | 6  |
| Figura 4 - Estrutura fenólica dos antioxidantes.....  | 11 |
| Figura 5 - Diagrama de distribuição das espécies do TBHQ em função do pH.....   | 12 |
| Figura 6 - Mecanismo de ação para o antioxidante TBHQ.....  | 13 |
| Figura 7 - Espectro de emissão de cetoconazol $1,01 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em meio aquoso ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 382$ nm).....   | 31 |
| Figura 9 - Espectro de emissão do cetoconazol $1,14 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> contendo diferentes concentrações dos surfactantes (A) BCTA e (B) Brij-35. Condições: em meio aquoso, ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 377$ nm).....                                  | 32 |
| Figura 8 - Espectro de emissão do cetoconazol $1,14 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> na ausência e presença de diferentes surfactantes.....  | 32 |
| Figura 10 - Dependência da intensidade de emissão em função da concentração dos surfactantes (A) BCTA e (B) Brij-35 para detecção de cetoconazol $1,14 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> (n = 2). Condições: em meio aquoso, ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 377$ nm)..... | 33 |
| Figura 11 - Espectro de emissão do cetoconazol $1,14 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em diferentes pH na presença de BCTA $0,10$ mol L <sup>-1</sup> . ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 377$ nm).....   | 34 |
| Figura 12 - Influência do pH na intensidade de emissão do cetoconazol $1,14 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> (n = 2) na presença de BCTA $0,10$ mol L <sup>-1</sup> . ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 377$ nm).....   | 35 |
| Figura 13 - Curva analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto (n = 3). Condições: em pH 8,80 na presença de BCTA $0,10$ mol L <sup>-1</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 375$ nm).....   | 36 |
| Figura 14 - Espectro de emissão do produto de degradação do cetoconazol $2,02 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> na presença de BCTA $0,10$ mol L <sup>-1</sup> . $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm.....  | 38 |
| Figura 15 - Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis da solução de TBHQ $1,76 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em meio aquoso.....   | 42 |
| Figura 16 - Diagrama de superfície correspondente à intensidade de emissão da solução de TBHQ $1,71 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em solução de HCl $0,1$ mol L <sup>-1</sup> .....   | 43 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17 - Espectro de (A) excitação e (B) emissão do TBHQ $1,76 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em solução de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 335$ nm. .... | 44 |
| Figura 18 – Estudo da influência do surfactante Brij-35 vs. pH sobre a intensidade de emissão. ( $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm). ....  | 45 |
| Figura 19 – Gráfico da distribuição das espécies de TBHQ em função do pH. ....  | 46 |
| Figura 20 - Estudo da influência do surfactante BCTA vs. pH sobre a intensidade de emissão. $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm. ....  | 47 |
| Figura 21 – Estudo da influência do surfactante DSS vs. pH sobre a intensidade de emissão. $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm. ....   | 48 |
| Figura 22 - Estudo da influência do surfactante Brij-35 vs. pH sobre a intensidade de emissão. $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm. ....   | 49 |
| Figura 23 - Espectro de emissão de soluções padrão de TBHQ. Meio contendo pH 2,09 e Brij-35 $5,0 \times 10^{-2}$ mol L <sup>-1</sup> . $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm. ....   | 50 |
| Figura 24 – Dependência da área do espectro de emissão em função da concentração de TBHQ. Condições: em pH 2,09 na presença de Brij-35 $5,0 \times 10^{-2}$ mol L <sup>-1</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 287$ nm). .... | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Procedimentos para determinação de cetoconazol.....   | 8  |
| Tabela 2 - Procedimentos para determinação de TBHQ.....  | 16 |
| Tabela 3 – Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para avaliação do efeito e interação dos parâmetros avaliados na determinação de TBHQ..... | 27 |
| Tabela 4 - Parâmetros químicos avaliados na otimização do procedimento espectrofluorimétrico.....  | 27 |
| Tabela 5 – Parâmetros de confiabilidade do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de cetoconazol.....               | 36 |
| Tabela 6 - Estudo da interferência dos produtos de degradação.....   | 38 |
| Tabela 7 - Estudo da recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas comerciais.....   | 39 |
| Tabela 8 - Estudo da recuperação de cetoconazol em amostras de água de rio.....  | 40 |
| Tabela 9 - Determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas.....   | 41 |
| Tabela 10 - Efeito da concentração do surfactante Brij-35 e pH sobre a emissão do TBHQ.....  | 49 |
| Tabela 11 – Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de TBHQ.....           | 51 |
| Tabela 12 - Estudo da recuperação de TBHQ em amostra comerciais.....   | 53 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| $\beta_0$       | Valor populacional da média de todas as respostas        |
| $\beta_1$       | Efeito do parâmetro pH                                   |
| $\beta_2$       | Efeito do parâmetro da concentração do surfactante       |
| $\lambda_{em}$  | Comprimento de onda de emissão                           |
| $\lambda_{exc}$ | Comprimento de onda de excitação                         |
| ANVISA          | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                 |
| BCTA            | Brometo de cetiltrimetilamônio                           |
| BHA             | Butil-hidroxi-anisol                                     |
| BHT             | Butil-hidroxitolueno                                     |
| Brij-35         | Polioxietileno lauril éter                               |
| CECM            | Cromatografia Eletrocinética Capilar Micelar             |
| CECM            | Cromatografia Eletrocinética Capilar Micelar;            |
| CG              | Cromatografia Gasosa                                     |
| CG/DIC          | Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama |
| CG/EM           | Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas |
| CLAE            | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                 |
| CLAE-DAD        | Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos  |
| CLAE-UV         | Cromatografia Líquida com detecção Ultravioleta          |
| CMC             | Concentração Micelar Crítica                             |
| DSS             | Dodecil sulfato de sódio                                 |
| ECV             | Eletrodo de Carbono Vítreo                               |
| ECZ             | Eletroforese Capilar de Zona                             |
| EEM             | Matriz de Excitação-Emissão                              |
| EMGS            | Eletrodo de mercúrio de gota suspensa                    |
| ETEs            | Estações de Tratamento de Esgoto                         |
| PG              | Propil Galato  |
| SB-12           | 3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato              |
| TBHQ            | Terc-butil-hidroquinona                                  |
| u. a            | Unidade Arbitrária                                       |
| VOQ             | Voltametria de Onda Quadrada                             |

VPD

VVL

Voltametria de Pulso Diferencial

Voltametria de Varredura Linear

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL E TBHQ EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL, ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICOS. O presente trabalho trata da aplicação da fluorescência molecular para a determinação de cetozonazol e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em amostras farmacêutica, ambientais e alimentícias. O procedimento desenvolvido para quantificação de cetozonazol não emprega reagentes tóxicos, sendo apenas necessário o uso de solução de etanol, bem como HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e surfactante Brij-35 para a etapa de extração e determinação, respectivamente. Os resultados indicaram a dependência do sinal de emissão com a concentração do surfactante. Os melhores resultados foram obtidos em brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) em pH 8,80. Uma curva analítica apresentando uma faixa linear de 1,01x10<sup>-8</sup> a 1,01x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (r = 0,998) e um limite de detecção de 1,83x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> foram obtidos. O procedimento proposto foi validado avaliando-se a recuperação do analito em amostras farmacêuticas e ambientais, obtendo-se recuperações entre 76,0-98,1 % e 93,8-103 %, respectivamente. Os resultados obtidos na determinação do cetozonazol em formulações farmacêuticas foram comparados com os resultados obtidos com um procedimento espectrofotométrico comparativo, onde os resultados não são diferentes a um nível de confiança de 95%. Na determinação de TBHQ um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> foi aplicado no sentido de determinar as condições ótimas para a obtenção da maior intensidade de emissão. Avaliando os efeitos principais e os fatores de interação de cada variável química. O TBHQ apresentou máximos de excitação e emissão em 287 nm e 335 nm. As melhores condições de análise o procedimento apresentou uma curva analítica linear de 1,02x10<sup>-6</sup> a 2,56x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (r = 0,9999). Um limite de detecção de 8,37x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> foi obtido. O procedimento foi utilizado para a determinação de TBHQ em amostras de creme vegetal, margarina, maionese e óleo vegetal. Recuperações de 84,7 a 109% foram obtidos para estas amostras. O procedimento mostrou-se de fácil aplicação, sem a necessidade de etapa de preparo de amostra laboriosa.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SPECTROFLUORIMETRIC PROCEDURES FOR DETERMINATION OF KETOCONAZOLE AND TBHQ IN SAMPLES OF ENVIRONMENTAL, FOOD AND PHARMACEUTICAL INTEREST. This work deals with the development analytical procedure for determination of Ketoconazole and TBHQ employing molecular spectrofluorimetry in samples of environmental, food and pharmaceuticals interests. These procedures developed do not use toxic reagents, in which it is only necessary the use of ethanol, as well as HCl 0.10 mol L<sup>-1</sup> and surfactant for extraction and determination steps, respectively. The results indicated the dependence of emission signal with kind of the surfactant and its concentration. The best conditions were obtained with Cetyltrimethylammonium Bromide at pH 8.80. A linear analytical curve until 1.01x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> of ketoconazole (r = 0.99) and a detection limit of 1.83x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> were obtained. The procedure was validated studying the recovery of ketoconazole in pharmaceutical and environmental samples. The recovery values between 76.0 to 98.1 % for water and 93.8 to 103% for pharmaceutical formulations were obtained. The results obtained on the determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations were compared with results obtained by comparative UV-Vis procedure, where no difference at 95% confidence level was found. In development of procedure for determination of TBHQ in samples food, a factorial design 2<sup>2</sup> was employed for determination of optimum conditions of sensitivity, evaluating the main effects and interaction factors of each variable. In the optimized conditions, the analytical curve was linear in 1.02x10<sup>-6</sup> to 2.56x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (r = 0.9999) and a detection limit of 8.37x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> was obtained. The developed procedure was employed for determination of TBHQ in vegetable cream, margarine, mayonnaise and vegetable oil. Recovery of 84.7 to 109% were obtained for these samples. The procedure was easy to apply without the need of laborious sample preparation step.

# 1. INTRODUÇÃO

---



## 1.1 Impactos dos fármacos no ambiente aquático

É notório que o crescimento demográfico e a expansão industrial trouxeram como consequência a contaminação atmosférica, do solo e dos recursos hídricos em diversas regiões do planeta. Com isso, tem havido uma maior conscientização de determinados setores quanto à deterioração do meio ambiente e a necessidade de controlar esse processo de degradação. Os órgãos governamentais que trabalham na área ambiental procuram atuar nas áreas de degradação, monitorando as espécies de interesse ambiental.

A composição química dos ambientes aquáticos vem sendo constantemente alterada por fenômenos da natureza e, numa maior extensão, por ação direta das atividades humanas. Dentre os muitos tipos de agentes contaminantes ambientais, um problema verificado recentemente é a alta concentração de substâncias que apresentam atividades biológicas. Estas concentrações derivam do intenso uso por grande parte da população de produtos farmacêuticos.

Os medicamentos que atingiram o prazo de validade indicado muitas vezes são descartados através do vaso sanitário ou lixo doméstico, aumentando a carga poluidora dos efluentes domésticos. Ainda, após a administração desses fármacos ocorre a absorção pelo organismo e são metabolizados, sendo uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos excretados por meio da urina e das fezes[1-3].

Outra fonte de contaminação ambiental por medicamentos são os efluentes de indústrias farmacêuticas, instalações hospitalares, efluentes rurais e a presença de fármacos no esterco animal utilizado para adubação de solo[2, 3]. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidos nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs)[4-6]. Desta forma, muitos resíduos de fármacos resistem a vários processos de tratamento convencional de água.

O grande consumo de medicamentos pela população vem acarretando o aparecimento de compostos farmacologicamente ativos nos efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) e nas águas naturais, em concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ [2]. Neste contexto, o monitoramento de fármacos residuais e seus metabólitos

no meio ambiente vêm ganhando interesse por parte da comunidade científica devido ao fato de muitas substâncias apresentarem atividade biológica.

A presença de fármacos no ambiente cresceu substancialmente durante os anos noventa, como consequência da publicação de dados mostrando a presença de contaminantes com atividade biológica em diversos ecossistemas[3]. Um exemplo desta situação é o estudo realizado por Heberer[7], no qual encontraram concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ácido clorifíbrico, primidona, carbamazepina e ibuprofeno em efluentes, efluentes de estações de tratamentos de esgoto e águas superficiais na cidade de Berlim-Alemanha. Neste mesmo estudo, concentrações do analgésico propifenazol e o antiinflamatório diclofenaco foram identificados em amostras de água potável nas concentrações de  $80 \text{ ng L}^{-1}$  e  $10 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente.

Recentemente, Valcárcel e seus colaboradores[6] desenvolveram um estudo para determinar a presença dos medicamentos que apresentam maior prescrição ou taxas de utilização, tais como drogas cardiovasculares, analgésico, antiinflamatório e antipirético, que estavam presentes nos rios e água de torneira na Região de Madri na Espanha. Das 24 substâncias analisadas, 21 foram detectadas em concentrações que variaram de  $2 \text{ ng L}^{-1}$  a  $18 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os medicamentos ibuprofeno, diclofenaco, furosemida, naxopreno, atenolol, gemfibrozil e hidroclorotiazida foram os que apresentaram concentrações mais elevadas.

No Brasil um estudo desenvolvido por STUMPF e colaboradores[5] detectaram a presença de antilipêmicos, antiinflamatórios e alguns metabólitos em esgoto, em efluente de ETEs e em águas de rios no estado do Rio de Janeiro. Em esgotos e águas superficiais, os antiinflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e cetoprofeno foram detectados nas concentrações na ordem de  $0,40$ ,  $0,60$  e  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Os fármacos são desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, seu uso desenfreado além de acarretar problemas ambientais como a contaminação dos recursos hídricos, pode contribuir para que alguns organismos criem resistência a essas substâncias, o efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismo, população e ecossistema[1].

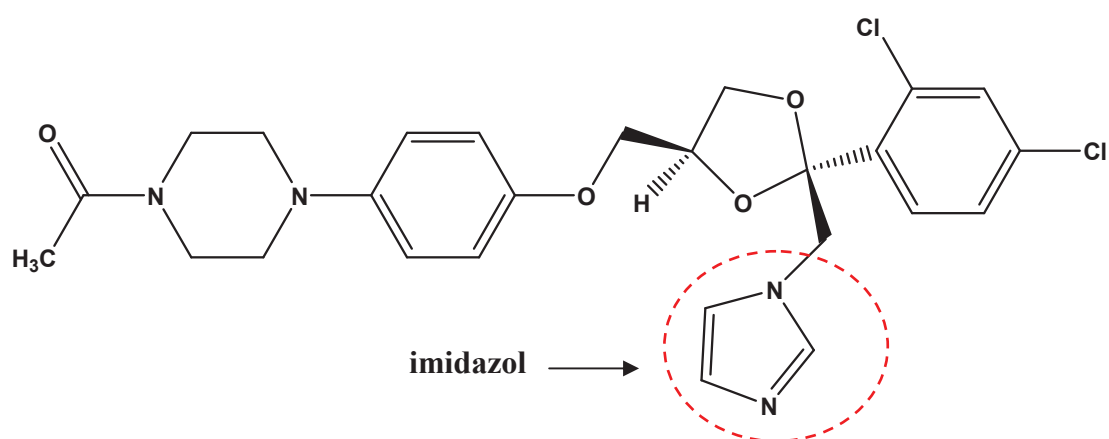
Dentro deste cenário é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis na determinação dos fármacos residuais em ambientes aquáticos. Na

literatura existem vários métodos analíticos para a determinação dessas substâncias em matrizes biológicas como sangue, urina e leite, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para verificar a ocorrência de fármacos em águas e efluentes em baixas concentrações.

## 1.2 Cetoconazol

### 1.2.1 Aspectos Gerais

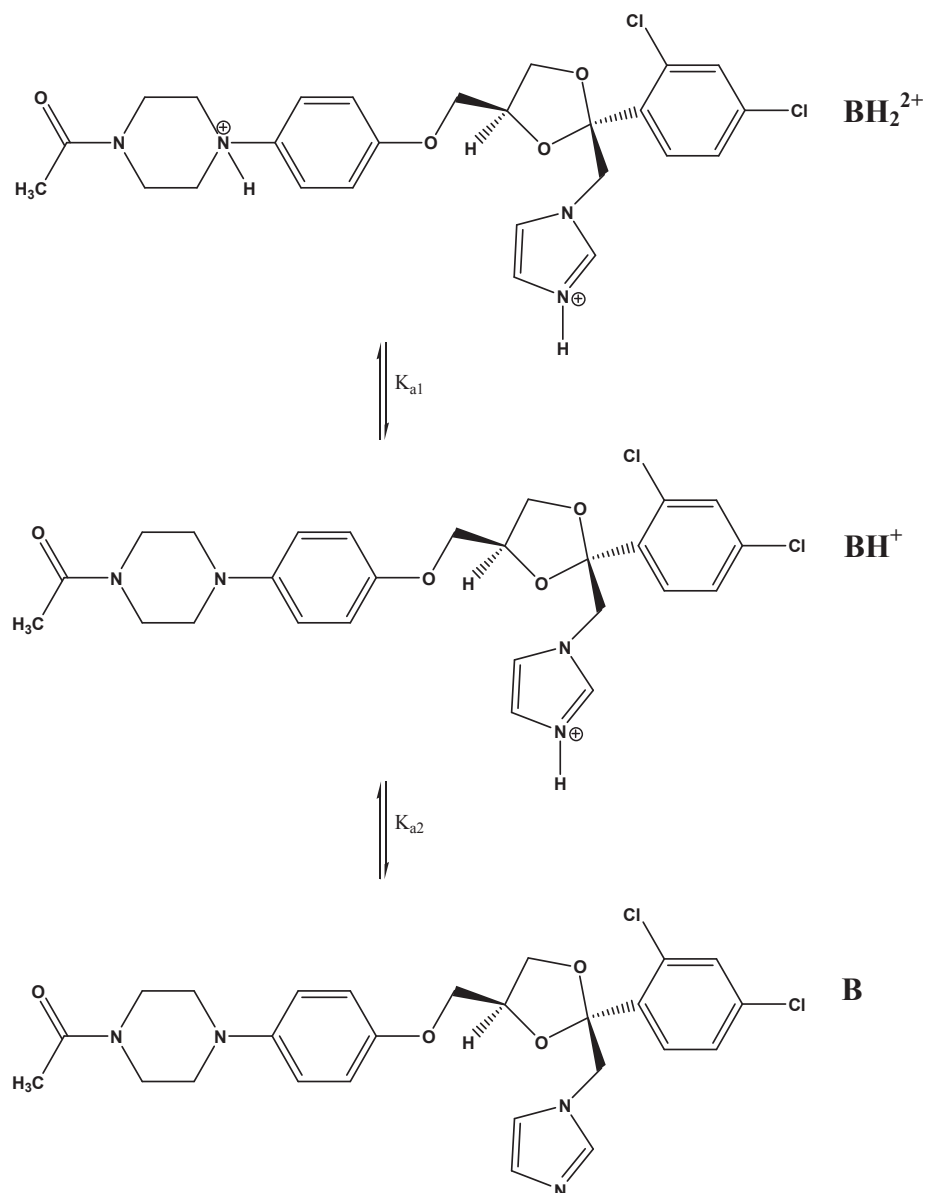
Cetoconazol é um derivado de imidazol, (*cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1ilmetil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, sendo utilizado como agente antifúngico. Sua fórmula molecular é  $C_{26}H_{28}Cl_2O_4N_4$  e sua estrutura química esta apresentada na Figura 1.



**Figura 1** - Estrutura química do cetoconazol.

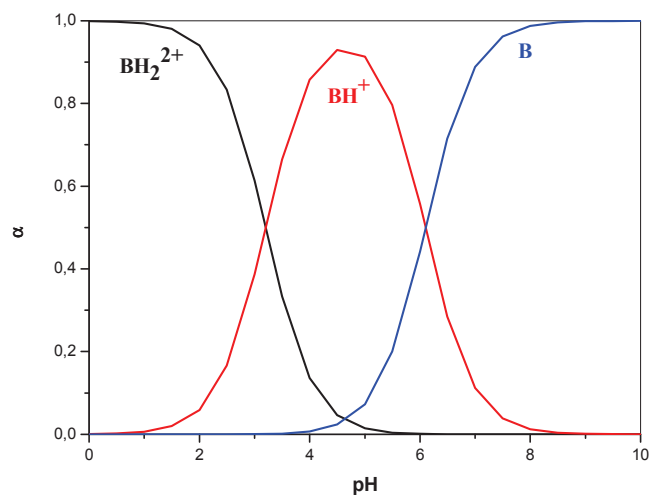
O cetoconazol é uma base fraca com  $pK_{a1} = 3,20$  e  $pK_{a2} = 6,10$ , sua forma molecular é ligeiramente hidrossolúvel[8]. Em soluções aquosas o cetoconazol pode sofrer reações de degradação, incluindo a oxidação e hidrólise, se este não estiver adequadamente formulado. Em meio ácido, o cetoconazol apresenta maior taxa de degradação, segundo estudos realizados por Skiba e colaboradores[9] a principal via de degradação é a oxidação.

Em solução aquosa, o seguinte equilíbrio é estabelecido para a molécula de cetoconazol (Figura 2)[8]:



**Figura 2** - Equilíbrio químico do cetoconazol.

Na Figura 3 está representado o diagrama de distribuição das espécies de equilíbrio de cetoconazol em função do pH[8]. As curvas de distribuição das espécies mostram que a concentração da espécie ( $BH_2^{2+}$ ) atinge um máximo em meio ácido. A medida que o pH aumenta, a concentração desta espécie decresce e aumenta a concentração da espécie ( $BH^+$ ), que atinge sua formação máxima em torno de pH 5. A espécie totalmente desprotonada (B) é encontrada próximo de pH 8.



**Figura 3** - Distribuição das espécies do cetoconazol em função do pH.

### 1.2.2 Mecanismo de ação e formas farmacêuticas

O cetoconazol foi sintetizado em 1979, sendo o primeiro azol administrado oralmente para tratamento de infecções sistêmicas por fungos, pode ser incorporado em várias formas farmacêuticas[10].

Como os demais derivados imidazólicos antifúngicos, o cetoconazol exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos sensíveis[3, 11, 12], que passam a perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo por fim, o rompimento da membrana. Esta ação decorre de sua interferência na síntese de esteróis da membrana, inibindo a formação do ergosterol a partir do seu precursor, o lanosterol[13]. Como acontece com todos os agentes antifúngicos, o cetoconazol funciona principalmente na inibição da enzima citocromo P-450, a qual é responsável pela biossíntese de esterol.

Devido ao seu poder antifúngico, o cetoconazol apresenta elevada eficácia no tratamento da candidíase, esofagiana, cutânea e vulvovaginal, nas dermatofitoses e pitiríase versicolor[11, 14].

Segundo VIÇOSA[13], no Brasil o cetoconazol é comercializado sob a forma de comprimido de 200 mg caixa com 10 ou 30 comprimidos, creme contendo 2 % de cetoconazol, bisnaga de 30 g e shampoo a 2 % em frasco de 100 mL.

### 1.2.3 Alguns métodos para determinação de cetoconazol

Diferentes métodos analíticos são descritos na literatura para determinação de cetoconazol, os quais são apresentados na Tabela 1. Entre estes destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta, métodos espectroscópicos, voltamétricos e termoanalíticos. No entanto, esses métodos são usados para determinação de cetoconazol principalmente em fluídos biológicos e formulações farmacêuticas.

Para tal fim, é útil que sejam desenvolvidas procedimentos analíticos que permitam determinar com rapidez, sensibilidade e baixo custo a concentração de cetoconazol em ambientes aquáticos. Nesse contexto, a espectrofluorimetria mostra-se como ferramenta promissora, já que exibe reduzido custo se comparada às técnicas cromatográficas, grande rapidez aliada a uma considerável seletividade, sensibilidade e simplicidade no tratamento das amostras. Além de evitar o uso de solventes orgânicos, os quais apresentam elevada volatilidade e toxicidade.

Recentemente, BEIGI e colaboradores[14] utilizando a técnica de CLAE com detecção ultravioleta em 212 nm desenvolveram uma metodologia para determinação de cetoconazol em amostras de leite bovino. A fase móvel foi composta de acetonitrila e tampão acetato de sódio (85:15, v/v) com pH ajustado a 4,6 a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

JALALI e AFHSOON[15] empregaram a reação entre o cetoconazol e  $\beta$ -ciclodextrina para desenvolver um procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas. O complexo de associação obtido entre o cetoconazol e  $\beta$ -ciclodextrina foi monitorado espectrofluorimetricamente em 370 nm. Segundo os autores, os resultados obtidos foram satisfatórios em relação ao método oficial (erro relativo = 2,8 % e desvio padrão = 0,06).

A técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) usando eletrodo polido de amálgama de prata sólido foi utilizada por DANTAS e colaboradores[3] para determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com os dados publicados utilizando eletrodo de mercúrio[16] e sólidos, como pasta de carbono[17], ouro e eletrodo de platina[18]. O método proposto foi satisfatório e sendo os resultados concordantes com os métodos descritos na literatura.

**Tabela 1** - Procedimentos para determinação de cetoconazol

| <b>Método</b>        | <b>Linearidade<br/>(mol L<sup>-1</sup>)</b>  | <b>Limite de detecção</b>   | <b>Amostra</b>                              | <b>Ref.</b> |
|----------------------|--|-----------------------------|---|-------------|
| VOQ                  | $4,97 \times 10^{-7} - 4,30 \times 10^{-6}$  | $61,1 \mu\text{g L}^{-1}$   | Comprimido, creme e shampoo                 | [3]         |
| Espectrofotometria   | $3,01 \times 10^{-6} - 3,01 \times 10^{-5}$  | $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$  | Comprimido, creme e shampoo                 | [11]        |
| CLAE-UV              | $1,13 \times 10^{-4} - 9,03 \times 10^{-4}$  | Não fornecido               | Shampoo                                     | [12]        |
| CLAE-UV              | $1,88 \times 10^{-7} - 1,88 \times 10^{-6}$  | $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  | Leite bovino                                | [14]        |
| Espectrofluorimetria | $5,00 \times 10^{-8} - 1,88 \times 10^{-5}$  | $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  | Comprimido, creme, shampoo e soro sanguíneo | [15]        |
| VPD                  | $1,00 \times 10^{-11} - 1,00 \times 10^{-9}$ | $28,16 \text{ ng L}^{-1}$   | Urina                                       | [16]        |
| VPD                  | $3,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$    | Não fornecido               | Comprimido e creme                          | [19]        |
| Espectrofluorimetria | $3,76 \times 10^{-8} - 1,88 \times 10^{-5}$  | $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$   | Comprimido, creme e shampoo, soro sanguíneo | [19]        |
| Espectrofluorimetria | $9,35 \times 10^{-8} - 1,50 \times 10^{-6}$  | $14,89 \text{ ng L}^{-1}$   | Comprimido                                  | [20]        |
| Espectrofotometria   | $6,47 \times 10^{-5} - 3,57 \times 10^{-4}$  | $10,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ | Comprimido e creme                          | [20]        |
| Espectrofotometria   | $2,18 \times 10^{-5} - 5,27 \times 10^{-4}$  | $3,48 \mu\text{g mL}^{-1}$  | Comprimido e creme                          | [20]        |
| Espectrofotometria   | $4,02 \times 10^{-10} - 3,21 \times 10^{-9}$ | $0,127 \mu\text{g L}^{-1}$  | Comprimido                                  | [21]        |
| ECZ                  | $2,35 \times 10^{-5} - 9,41 \times 10^{-4}$  | $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$    | Comprimido e creme                          | [22]        |
| CLAE-UV              | $2,82 \times 10^{-8} - 1,88 \times 10^{-5}$  | $5 \mu\text{g L}^{-1}$      | Plasma sanguíneo de cães                    | [23]        |
| CLAE-DAD             | $7,52 \times 10^{-9} - 9,41 \times 10^{-6}$  | $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$    | Soro sanguíneo                              | [24]        |

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada; CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta; VPD – Voltametria de Pulso Diferencial; ECZ – Eletroforese Capilar de Zona; CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos.

### 1.3 A importância dos antioxidantes

Os antioxidantes são compostos químicos utilizados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica nos produtos alimentares, uma vez que os óleos e gorduras essenciais para a nossa dieta tendem a ter problemas de oxidação que afetam a qualidade dos alimentos e podem colocar em risco a saúde humana[25, 26].

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes extensões, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo[26].

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos[26, 27].

De acordo com a revisão de RAMALHO e JORGE[26], os lipídeos podem ser oxidados por diferentes caminhos:

A. **Reações Hidrolíticas:** são reações ocasionadas pela ação de enzimas lípases ou pela ação de calor e umidade, que rompem a ligação éster dos lipídeos, liberando ácidos graxos livres.

B. **Oxidação enzimática:** são reações que ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas.

C. **Fotoxidação:** mecanismo ocorrido em gorduras insaturadas promovido pela radiação ultravioleta em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ).

O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos.



D. **Autoxidação:** é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras.

Este processo ocorre em três etapas:

- **Iniciação** – o início da reação decorre da interação de um iniciador com o oxigênio, que uma vez ativado, pode reagir com o ácido graxo insaturado, ocorrendo à retirada de um átomo de hidrogênio do carbono alílico na molécula de ácido graxo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos, segundo a reação:



- **Propagação** - os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico:



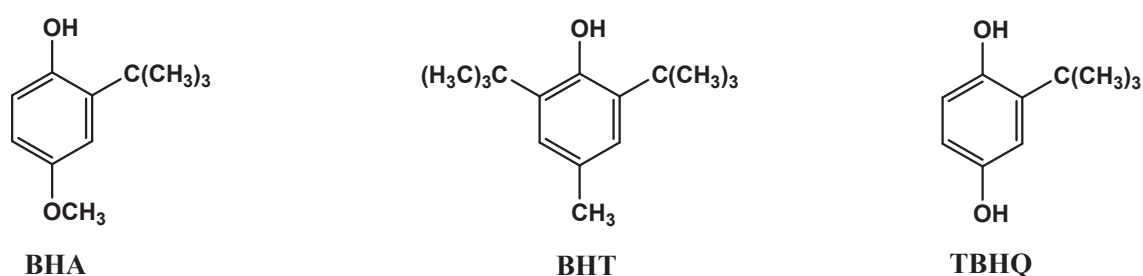
- **Término** - dois radicais combina-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis):



Para evitar a autoxidação há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz),

evitando ao máximo o contato com oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres[26].

Com o objetivo de prevenir a oxidação de óleos e gorduras são adicionadas antioxidantes aos alimentos, que atuam interferindo nos processos de oxidação dos lipídios. Segundo YANG e colaboradores[28], a maioria dos antioxidantes utilizados nos alimentos contém um grupamento fenólico, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Seu emprego ocorre devido a sua estabilidade química, baixo custo e disponibilidade. A Figura 4 apresenta a estrutura molecular dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ.



**Figura 4** - Estrutura fenólica dos antioxidantes.

Dentre os antioxidantes fenólicos apresentados na Figura 4, o TBHQ é o mais eficiente, em especial para óleos vegetais. É resistente a altas temperaturas, menos volátil que o BHA e o BHT e tem *carry through* razoável em produtos assados e excelente em frituras, comparável ao do BHA[29], ou seja, apresenta uma capacidade de escapar da degradação no processamento para obter produtos assados e fritos.

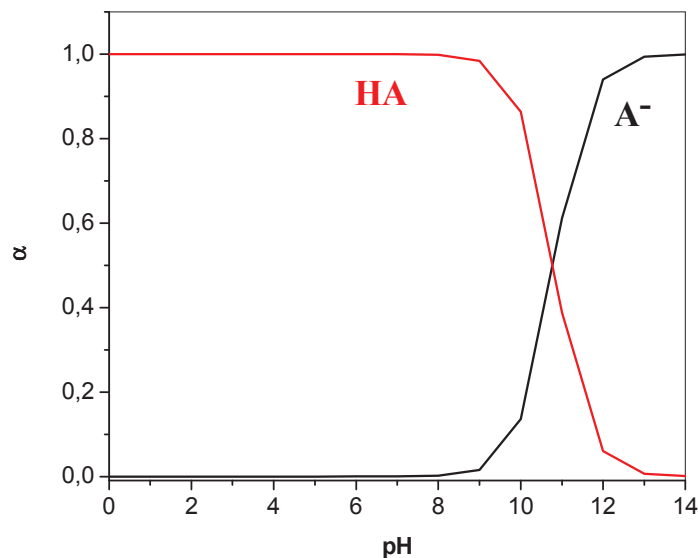
## 1.4 Terc-butil-hidroquinona

### 1.4.1 Aspectos Gerais

Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) é um derivado de hidroquinona. É um antioxidante sintético utilizado com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos[26]. Possui fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> e sua estrutura química esta apresentada na Figura 4.

Na Figura 5 apresenta-se o diagrama de distribuição das espécies de equilíbrio de TBHQ em função do pH (pKa=10,8). As curvas de distribuição das espécies mostram que em pH ácido a molécula de TBHQ encontra-se totalmente protonada

(HA). A medida que o pH aumenta, a concentração desta espécie decresce e aumenta a concentração da espécie ( $A^{2-}$ ), que atinge sua formação máxima em torno de pH 12.



**Figura 5** - Diagrama de distribuição das espécies do TBHQ em função do pH.

#### 1.4.2 Característica e mecanismo de ação

TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras. É considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT; em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT. O TBHQ é considerado também o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados[26].

A estrutura fenólica deste composto (Figura 4) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres[26, 30]. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação conforme Figura 6.



**Figura 6** - Mecanismo de ação para o antioxidante TBHQ.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres  $\text{R}\cdot$  e  $\text{ROO}\cdot$  com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ( $\text{A}\cdot$ ) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas[26].

No Brasil, o uso deste antioxidante é controlado pelo Ministério da Saúde, a legislação que regulamenta é a Resolução nº 04/88 – CNS/MS 23, de 24 de novembro de 1988 da ANVISA, que limita 200 mg/kg de TBHQ como concentração máxima permitida.

### 1.4.3 Metodologia para determinação de TBHQ

Uma variedade de métodos são descritos para a quantificação de antioxidantes devido à grande importância dos antioxidantes no retardamento das reações oxidativas em matrizes como: alimentos, óleos e gorduras, cosméticos, biodiesel entre outros. Atualmente, várias metodologias analíticas tem sido desenvolvidas para detectar e quantificar os antioxidantes. Esses métodos incluem desde a detecção qualitativa através de reações colorimétricas até métodos quantitativos, como voltametria, polarografia, espectrofotometria e cromatografia, sendo esta última a que exibe maior número de trabalhos.

A técnica de Cromatografia Gasosa (CG) com detector de ionização de chama foi utilizada por YANG e colaboradores[28] para determinação simultânea dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ em óleos comestíveis e gorduras. A análise de cada amostra levou 18 min. e as recuperações de antioxidantes de óleos de cozinha foram de 92,5 a 108,4 %.

GUAN e colaboradores[31] desenvolveram um procedimento analítico utilizando Cromatografia Eletrocínética Capilar Micelar (CECM) com detecção

eletroquímica para determinar BHA, BHT, TBHQ e propil galato (PG) em cosméticos e produtos alimentícios.

Utilizando CLAE juntamente com um espectrômetro de massas por captura de íons HAO e colaboradores[32] propuseram uma metodologia para determinação de TBHQ em óleo vegetal comestível, a recuperação das amostras fortificadas variou de 81,9 a 110,5 %. DING e ZOU[25] desenvolveram uma metodologia para determinar BHT, BHA e TBHQ em óleos vegetais por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM), o método envolve duas etapas de microextração e uma centrifugação, sendo consumidos apenas 50 mg de amostra e 1 mL de acetonitrila. As recuperações dos antioxidantes fenólicos variaram de 95,6-104,3, 99,7-107,5 e 93,6-103,8 para BHT, BHA e TBHQ, respectivamente.

TAKEMOTO e colaboradores[33] utilizando a técnica de CLAE com detecção ultravioleta em 280 nm analisaram os antioxidantes sintéticos PG, TBHQ, BHA e BHT em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas. A metodologia mostrou-se eficiente, com taxas de recuperação acima de 90 % para todas as substâncias, além de boa linearidade na faixa de concentração de 40-240 mg Kg<sup>-1</sup> e limite de quantificação 16,55, 10,32, 1,40 e 9,30 mg Kg<sup>-1</sup> para o BHT, BHA, PG e TBHQ, respectivamente.

A técnica de amperometria foi utilizada por TORMIN e colaboradores[34] para a determinação direta do TBHQ em biodiesel de soja em eletrodo de carbono vítreo. As amostras foram também analisadas por cromatografia líquida, sendo que os resultados obtidos com o método amperométrico apresentaram boa concordância com os do método cromatográfico. As recuperações com o método amperométrico para amostra foram entre 90% e 95 %.

ARAÚJO e demais autores [35] utilizando a técnica de Voltametria de Varredura Linear (VVL) em eletrodo de pasta de carbono, propuseram uma metodologia para determinação eletroanalítica de TBHQ em biodiesel etílico de soja para efeito de comparação foi utilizado CLAE e os resultados mostraram boa concordância. Segundo os autores, o método voltamétrico proposto tem as vantagens de ser mais simples, mais rápido e de requerer menor quantidade de solventes orgânicos que os procedimentos de CLAE.

Esse mesmo grupo desenvolveu um método eletroanalítico para determinação de TBHQ em amostras de biodiesel de soja, na presença de surfactante Triton X-100 utilizando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) em eletrodo de gota de

mercúrio suspensa (EGMS)[36]. Os resultados obtidos pelo método polarográfico foram satisfatórios em relação aos obtidos por CLAE.

CARAMIT e colaboradores[37] usaram eletrodos impresso de carbono para a determinação simultânea e quantificação de TBHQ e BHA em biodiesel empregando a técnica voltamétrica e tampão Britton-Robinson como eletrólito suporte. Os limites de detecção obtidos foram  $3,40 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para TBHQ e  $1,76 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para o BHA.

Na Tabela 2 são apresentados alguns trabalhos descritos na literatura para a determinação do antioxidante fenólico TBHQ.

**Tabela 2** - Procedimentos para determinação de TBHQ

| <b>Técnica</b> | <b>Extração</b>                  | <b>Região Linear de resposta<br/>(mol L<sup>-1</sup>)</b>   | <b>Limite de Detecção<br/>(mol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Amostra</b>                                     | <b>Ref.</b> |
|----------------|----------------------------------|---|--|--|-------------|
| CG/EM          | Acetonitrila                     | 6,0x10 <sup>-8</sup> - 1,20x10 <sup>-4</sup>  | 2,4x10 <sup>-8</sup>                               | Óleos vegetais                                     | [25]        |
| CG/DIC         | Éter dietílico                   | Não fornecido   | 6,0x10 <sup>-7</sup>                               | Óleos comestíveis e gorduras hidrogenadas          | [28]        |
| CECM           | Etanol                           | 2,0x10 <sup>-6</sup> – 2,0x10 <sup>-4</sup>   | 8,0x10 <sup>-7</sup>                               | Cosméticos e Alimentos                             | [31]        |
| CLAE           | Etanol                           | Não fornecido   | Não fornecido                                      | Óleo vegetal comestível                            | [32]        |
| CLAE/UV        | Hexano saturado com acetonitrila | 40-240 mg Kg <sup>-1</sup>  | 2,79 mg Kg <sup>-1</sup>                           | Óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas | [33]        |
| Amperometria   | -                                | 6,0x10 <sup>-5</sup> - 6,0x10 <sup>-4</sup>   | 5,0x10 <sup>-6</sup>                               | Biodiesel de soja                                  | [34]        |
| VVL            | Metanol                          | 9,95x10 <sup>-7</sup> - 9,53x10 <sup>-6</sup>   | 4,36x10 <sup>-7</sup>                              | Biodiesel  | [35]        |
| VOQ            | Metanol                          | 1,05x10 <sup>-6</sup> - 10,10x10 <sup>-6</sup>  | 3,43x10 <sup>-8</sup>                              | Biodiesel  | [36]        |
| VVL            | -                                | 5,0x10 <sup>-7</sup> - 1,0x10 <sup>-5</sup>   | 3,40x10 <sup>-7</sup>                              | Biodiesel  | [37]        |
| VPD            | Solução metanol (50%)/água       | 2,0x10 <sup>-5</sup> - 1,4x10 <sup>-4</sup><br>1,2x10 <sup>-4</sup> - 2,2x10 <sup>-4</sup>  | 7,4x10 <sup>-6</sup>                               | Creme de cogumelo fortificado                      | [38]        |
| VOQ            | Metanol                          | GCE: 4-100 mg L <sup>-1</sup><br>Pt: 10-130 mg L <sup>-1</sup>  | Não fornecido                                      | Maionese   | [39]        |
| VOQ            | -                                | 1,0x10 <sup>-7</sup> - 1,0x10 <sup>-6</sup><br>1,0x10 <sup>-6</sup> - 1,0x10 <sup>-5</sup><br>1,0x10 <sup>-5</sup> - 1,0x10 <sup>-4</sup> | 6,2x10 <sup>-8</sup>                               | Amostra de milho de pipoca fortificada             | [40]        |

CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa; CG/DIC – Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama; CECM - Cromatografia Eletrocínica Capilar Micelar; CLAE-UV – Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência; CLAE-UV – Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta; VVL – Voltametria de Varredura Linear; VOQ – Voltametria de Onda Quadrada; VPD – Voltametria de Pulso Diferencial; ECV - Eletrodo de Carbono Vítreo.

## 1.5 Surfactantes

Surfactantes (ou tensoativos) simplificação do termo “agente ativo de superfície”, refere-se à classe de compostos anfífilicos constituídos de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar)[41]. As principais características do uso de surfactantes estão relacionadas à formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambiente micelares[42].

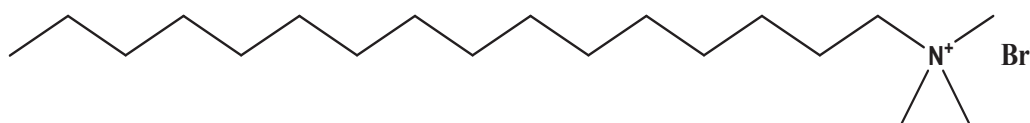
Um surfactante típico possui a estrutura R – X, onde R é uma cadeia de hidrocarbonetos variando de 8 -18 átomos de carbono (normalmente linear) e X o grupo cabeça polar (ou iônico). Dependendo de X, os surfactantes podem ser classificados como[43]:

**A. Surfactantes não-iônicos:** não ionizam em solução aquosa, porque o seu grupo hidrofílico é de um tipo não-dissociável, tal como álcool, fenol, éter, éster ou amida.



**Polioxietileno lauril éter (Brij-35)**

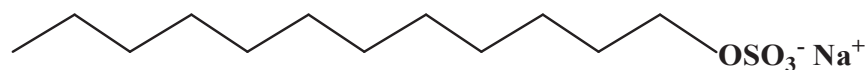
**B. Surfactantes catiônicos:** são dissociados em água em um cátion e um ânion, normalmente, um halogênio. Uma grande porção dessa classe corresponde os compostos de nitrogênio, tais como sais de amônio quaternário, com uma ou várias cadeias do tipo alquila.



**Brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA)**

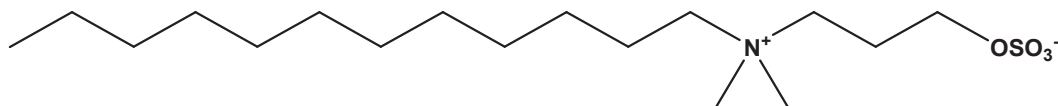
**C. Surfactantes aniônicos:** são dissociados em água na forma de um ânion (parte hidrofóbica), e um cátion, o qual geralmente é um metal alcalino ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ou amônio quaternário.





**Dodecil sulfato de sódio (DSS)**

**D. Surfactantes anfóteros:** são moléculas que se dissociam tanto em cátions, como em ânions. É o caso de produtos sintéticos como betaínas ou sulfobetainas e substâncias naturais tais como aminoácidos e fosfolípideos.



**3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)**

Os surfactantes são importantes em química analítica devido à sua capacidade em modificar o meio reacional, permitindo solubilizar espécies de baixa solubilidade ou promover um novo meio que pode modificar a velocidade reacional, a posição de equilíbrio das reações químicas e alguns casos a estereoquímica destas dependendo da natureza da reação, do tipo de reativo (eletrofílico, nucleofílico, etc) e do tipo de forma (catiônica, aniônica, etc) da micela.

Pode-se destacar o emprego de ambiente micelares principalmente sob dois aspectos, o primeiro se refere à exploração das características do ambiente micelar, formado no meio reacional para a melhoria da sensibilidade e/ou seletividade, e o segundo se relaciona a etapas de concentração e/ou separação, empregando tensoativos em substituição às metodologias tradicionais (extração líquido-líquido, troca iônica) pela separação em duas fases isotrópicas, fenômeno este denominado ponto de névoa.

Micelas são agregados moleculares que apresentam ambas as regiões estruturais, hidrofílica e hidrofóbica, que se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração micelar crítica (CMC), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais. Próxima da CMC existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros[42]. Estas características têm sido empregadas em fluorescência, pois apresenta vantagens sobre ambientes convencionais de medidas nas quais incluem o aumento da sensibilidade e a redução da interferência. Vários estudos avaliando a aplicação de ambientes micelares em métodos fluorimétricos têm sido descritos na literatura[15, 19, 44-48].

Algumas soluções de certos surfactantes não-iônicos quando aquecidos acima de uma temperatura (temperatura de ponto de névoa) exibem uma interessante propriedade de

separar-se em duas fases. Depois de formadas as fases e o sistema centrifugado, duas fases líquidas são obtidas[42, 49]. Uma fase contém o surfactante enquanto a outra contém o surfactante com concentração próxima a CMC. A fase orgânica tem sido intensamente empregada para a pré-concentração de soluções contendo diversos analitos como princípios ativos[32, 50].

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2.1 Objetivos Gerais**

Desenvolvimento de procedimentos analíticos espectrofluorimétricos para determinação de cetoconazol e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em amostras de interesse ambiental, farmacêutico e produtos alimentícios.

## **2.2 Objetivos Específicos**

### **Cetoconazol**

- Estudar o comportamento dos surfactantes Brij-35, BCTA e DSS na fluorescência do cetoconazol;
- Desenvolver metodologia analítica simples, rápida e de baixo custo que permita determinar a concentração de cetoconazol em diferentes matrizes (amostra de água, comprimidos, shampoo, suspensão e spray);

### **TBHQ**

- Investigar o comportamento dos surfactantes Brij-35, BCTA e DSS na fluorescência do TBHQ;
- Utilizar o planejamento experimental com análise de superfície de resposta para investigar interações entre fatores, como concentração dos surfactantes e pH;
- Aplicar a metodologia desenvolvida para determinação da concentração de TBHQ em amostras de creme vegetal, margarina, maionese e óleo de soja.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

---

## **3.1 Equipamentos**

### **3.1.1 Balança analítica**

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica modelo FA104N com precisão de 0,1 mg.

### **3.1.2 Cuba de ultrassom**

Um banho ultrassônico (Cristófilo, São Paulo-SP) foi utilizado para dissolução dos reagentes.

### **3.1.3 pHmetro**

As determinações de pH das soluções foram feitas em um medidor de pH marca HANNA conectado a um eletrodo de vidro combinado e sensor de temperatura em aço inox, previamente calibrado com o uso de soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

### **3.1.4 Espectrofotômetro**

As medidas espectrofométricas foram realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-Vis Cary, modelo 50 CONC (Varian<sup>®</sup>) com cubeta de quartzo de 3,5 mL (caminho óptico 10 mm).

### **3.1.5 Espectrofluorímetro**

As medidas fluorimétrica foram realizadas em espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando-se cubeta de quartzo, com quatro faces polidas, caminho óptico de 10 mm e volume de 3,5 mL.

## **3.2 Reagentes e soluções**

A solução estoque de cetoconazol  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada momento antes do seu uso dissolvendo-se uma massa apropriada de cetoconazol (Galena, Campinas-SP, lote

KET/M-10610, 99% pureza) em água contendo algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões de 10,00 mL, completando-se o volume com água destilada.

A solução estoque de TBHQ  $2,40 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 100 mg desse reagente (Aldrich, 97% pureza) em um balão volumétrico de 25,00 mL com etanol. As soluções de trabalho foram preparadas pelas diluições adequadas em balões volumétricos de 10,00 mL, completando-se o volume inicialmente com água destilada.

A solução tampão de fosfato de potássio monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (Vetec, 99% pureza) foi preparada pela adição de ácido clorídrico concentrado ou solução de hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$ )  $5,0 \text{ mol L}^{-1}$  para ajuste do pH.

Soluções estoques dos surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA), dodecil sulfato de sódio (DSS) e polioxietileno lauril éter (Brij-35)  $0,20$  e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparada dissolvendo-se uma massa apropriada em água destilada. Todos os surfactantes empregados foram de grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro).

### 3.3 Amostras

As amostras dos medicamentos a base de cetoconazol foram obtidas no comércio local em Dourados - MS:

- Cetomed<sup>®</sup> (CIMED Indústria de Medicamentos Ltda, Minas Gerais) contendo 30 comprimidos com 200 mg de cetoconazol por comprimido;
- Cetoconazol<sup>®</sup> (Laboratório TEUTO Brasileiro S/A, Goiás) contendo 30 comprimidos com 200 mg de cetoconazol por comprimido;
- Creartop<sup>®</sup> (CIMED Indústria de Medicamentos Ltda, Minas Gerais) contendo 20 mg de cetoconazol em 1 mL de shampoo;
- Cetoconazol<sup>®</sup> (Laboratório Ibase Ltda, Rio Grande do Sul) suspensão oral contendo 20 g de cetoconazol em 100 mL do produto;
- Cetoconazol<sup>®</sup> (Laboratório Ibase Ltda, Rio Grande do Sul) spray contendo 2 g de cetoconazol em 100 mL do produto.

As amostras de água utilizadas foram provenientes do rio Dourados (Dourados/MS).

Para os estudos no desenvolvimento do procedimento para a determinação de TBHQ, as amostras foram adquiridas em estabelecimento local de Dourados-MS:

- Creme vegetal Primê<sup>®</sup> (Coamo, Agroindústria cooperativa, Paraná);

- Margarina Claybom<sup>®</sup> (Sadia S.A., Minas Gerais);
- Margarina Qualy<sup>®</sup> (Sadia S.A., Paraná);
- Maionese Hellmann's<sup>®</sup> (Unilever Brasil Industrial Ltda, Goiás);
- Óleo de soja Concórdia<sup>®</sup> (ADM do Brasil Ltda, Mato Grosso do Sul).

### **3.4 Procedimentos experimentais**

#### **3.4.1 Obtenção do espectro de fluorescência para determinação de Cetoconazol e TBHQ**

Para obtenção dos espectros de emissão, soluções de cetoconazol em meio BCTA 0,10 mol L<sup>-1</sup> e tampão fosfato de potássio monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH = 8,80), foram excitadas a um comprimento onda de 288 nm e a varredura do monocromador de emissão foi de 310 a 800 nm. As janelas de excitação e de emissão tiveram abertura de 5 nm.

Os espectros de emissão do TBHQ foram obtidos em meio Brij-35 5,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> e tampão fosfato de potássio monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH = 2,00), as soluções foram excitadas a um  $\lambda_{exc}$  de 287 nm e a varredura do monocromador de emissão foi de 297 a 800 nm. As janelas de excitação e de emissão tiveram abertura de 5 nm.

#### **3.4.2 Preparo das amostras**

##### **3.4.2.1 Amostras de cetoconazol**

Foram pesados e triturados cerca de 5 comprimidos de cada amostra (A e B) em almofariz com pistilo. Massas exatamente pesadas do pó contendo cetoconazol foram dissolvidas em água contendo algumas gotas de ácido clorídrico concentrado em balões volumétricos de 100,00 mL. Após 5 minutos de tratamento em banho de ultrassom, a suspensão resultante foi filtrada. Procedimento semelhante foi aplicado para a preparação das amostras de shampoo e água de rio. As amostras de suspensão e spray foram pipetadas uma quantidade apropriada da amostra e dissolvida em solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> em balão volumétrico de 100,00 mL.



Após o preparo das amostras, alíquotas destas soluções recém-preparadas foram transferidas para balões volumétricos de 10,00 mL, a estas soluções foram adicionados 5,0 mL de BCTA  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , 2,0 mL de solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e o volume completado com água destilada.

#### **3.4.2.2 Amostras de TBHQ**

As amostras de creme vegetal, margarina, maionese e óleo vegetal para determinação de TBHQ foram preparados através de solubilização em etanol.

Para o preparo destas soluções, quantidades apropriadas das amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de etanol, este material foi então centrifugado por 20 minutos para melhor separação. Com auxílio de micropipetas alíquotas das soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10,00 mL contendo 5,0 mL de Brij-35  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , 2,0 mL de solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e o volume completado com água destilada.

O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação de cetoconazol e TBHQ nas amostras pelo procedimento proposto.

#### **3.4.3 Medidas espectrofotométricas**

As medidas espectrofotométricas foram realizadas com objetivo de estabelecer a comparação com os resultados obtidos através da metodologia espectrofluorimétrica proposta.

O procedimento utilizado foi adaptado da metodologia desenvolvida por Vojic e colaboradores[51]. As soluções amostras foram preparadas dissolvendo uma massa apropriada do pó contendo cetoconazol em solução de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  em balões volumétricos de 100,00 mL. Após 5 minutos de tratamento em banho ultrassom, a suspensão resultante foi filtrada. Alíquotas apropriadas do filtrado foram transferido para balões volumétricos de 10,00 mL e o volume completado com solução de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Procedimento semelhante foi aplicado para a preparação da amostra de shampoo.

As medidas espectrofotométricas constituíram-se na determinação direta de cetoconazol baseado na absorção do cetoconazol em meio de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  no comprimento de onda de 223 nm, a absorbância obtida foi comparada com solução padrão de cetoconazol  $1,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.4.4 Planejamento fatorial

Para otimização do procedimento proposto para determinação de TBHQ empregou-se o método de planejamento fatorial  $2^2$ , para avaliação do maior efeito na resposta (intensidade de emissão) proporcionada pelo surfactante avaliado na determinação quantitativa de TBHQ em solução aquosa.

O planejamento fatorial foi realizado explorando-se os níveis máximos e mínimos de cada parâmetro químico (pH e surfactante), com o objetivo de verificar o efeito de cada um desses parâmetros e as interações entre eles. Dessa maneira, foram realizados 4 experimentos em duplicata, conforme Tabela 3.

**Tabela 3** – Planejamento fatorial  $2^2$  para avaliação do efeito e interação dos parâmetros avaliados na determinação de TBHQ

| Ensaio | pH | Surfactante |
|--------|----|-------------|
| 1      | -1 | -1          |
| 2      | +1 | -1          |
| 3      | -1 | +1          |
| 4      | +1 | +1          |

Medidas de emissão de fluorescência foram feitas utilizando soluções padrão aquosas de TBHQ descrita no item 3.2, em duplicata através de repetições autênticas e de maneira aleatória. Na Tabela 4 são mostrados os diferentes fatores químicos avaliados os correspondentes níveis avaliados (os símbolos “+” e “-” indicam a maior e a menor concentração ou pH, respectivamente).

**Tabela 4** - Parâmetros químicos avaliados na otimização do procedimento espectrofluorimétrico

| Surfactante | Níveis                                  |   |
|-------------|---|---|
|             | -1                                      | +1                                      |
| Brij-35     | $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ | $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ |
| BCTA        | $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ | $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ |
| DSS         | $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ | $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ |
| pH          | 7,04                                    | 10,77                                   |

### **3.5 Procedimento para a validação do método proposto**

#### **3.5.1 Determinação da linearidade**

O estudo do intervalo linear de trabalho foi determinado pelas determinações da intensidade de emissão nas condições já otimizadas.

A faixa linear da curva analítica foi determinada considerando-se a regressão linear, entre os valores de intensidade de emissão e concentração da solução padrão, pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), adotando o parâmetro  $R^2 > 0,99$  como aquele que define a faixa linear, conforme a recomendação do GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS, publicado pela Anvisa[52].

#### **3.5.2 Estudo de recuperação**

No estudo da recuperação, alíquotas diferentes da solução de referência do analito foram adicionadas em soluções contendo um volume de amostra. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados com a quantidade do analito adicionado na alíquota da solução padrão. Este estudo avalia a interferência da matriz da amostra sob o sinal analítico do procedimento espectrofluorimétrico proposto.

#### **3.5.3 Preparação do produto de degradação ácida e de oxidação do cetoconazol**

Com a finalidade de avaliar o efeito dos produtos de degradação do cetoconazol durante a determinação de cetoconazol pelo procedimento proposto, duas soluções de cetoconazol  $2,02 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> foram preparadas, ambas o cetoconazol foi dissolvido em solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Os produtos da hidrólise foram obtidos mantendo a solução padrão em ebulição sob refluxo por 30 minutos. Já os produtos de degradação por oxidação foram obtidos adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%), em seguida a solução foi aquecida até a ebulição sob refluxo por 30 minutos. As soluções resultantes foram resfriadas e alíquotas

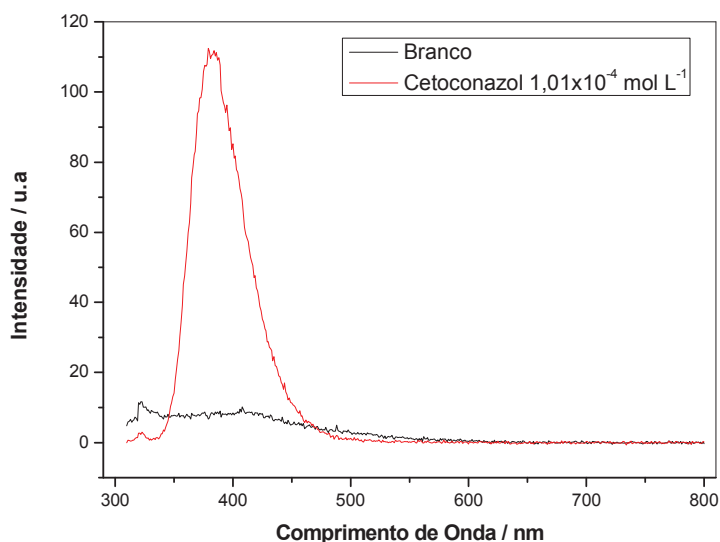
apropriadas foram diluídas em 5,0 mL de BCTA  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , 2,0 mL de solução tampão (pH = 8,80) e o volume completado com água destilada.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### 4.1 Desenvolvimento de um espectrofluorimétrico para determinação de cetoconazol em água de rio e produtos farmacêuticos

Inicialmente, foi registrado espectro de emissão da solução aquosa de cetoconazol  $1,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , conforme mostrado na Figura 7. A substância quando excitada no comprimento de onda de 288 nm apresenta emissão máxima em torno de 382 nm[19].

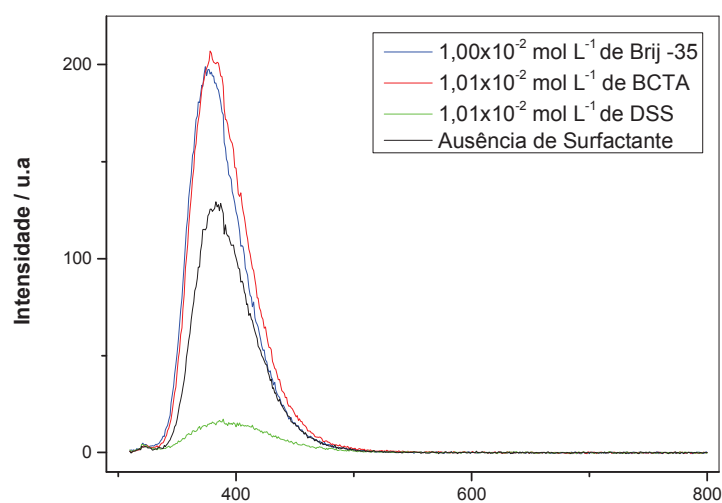


**Figura 7** - Espectro de emissão de cetoconazol  $1,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio aquoso ( $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 382 \text{ nm}$ ).

##### 4.1.1 Estudo dos efeitos dos parâmetros químicos sobre o sinal de emissão

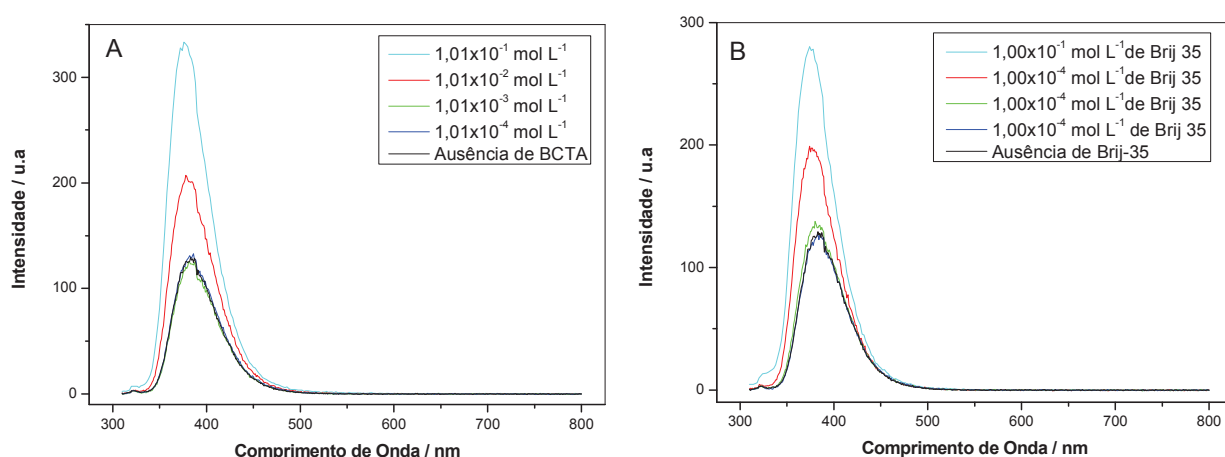
Devido à espectrometria de luminescência molecular ser uma técnica influenciada por diversos fatores químicos, os parâmetros químicos foram otimizados univariavelmente, buscando a melhor relação entre sensibilidade e repetibilidade.

Primeiramente, foi obtido espectro de emissão de uma solução de cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na ausência e na presença de diferentes surfactantes, nas concentrações apresentadas na Figura 8 e 9.



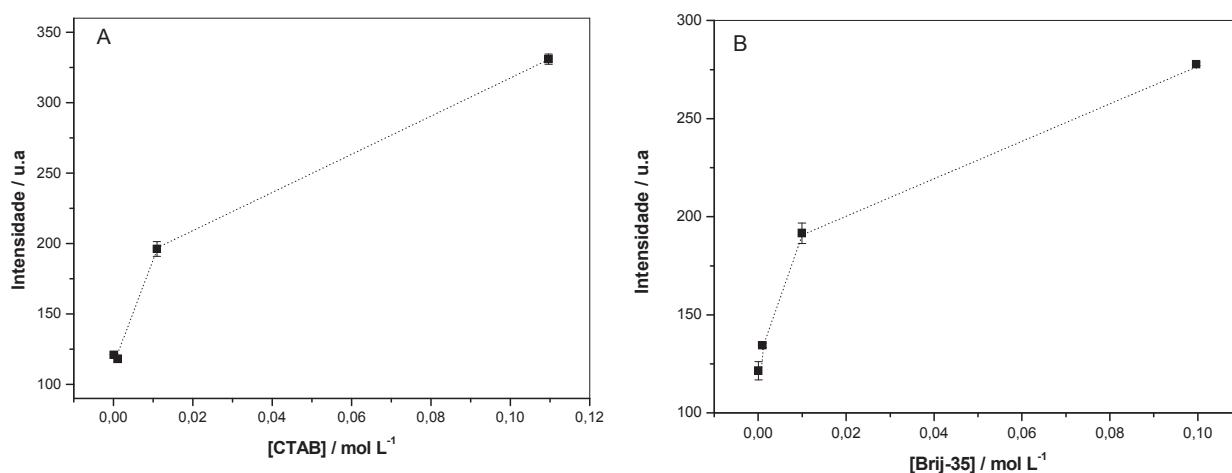
**Figura 8** - Espectro de emissão do cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na ausência e presença de diferentes surfactantes.

Nos estudos realizados com os surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) e polioxietileno lauril éter (Brij-35) resultaram em medidas com maior intensidade de emissão e melhoria na resolução do espectro como mostrado na Figura 8. Porém, as medidas realizadas com adição do surfactante dodecil sulfato de sódio (DSS) resultaram em um decréscimo na intensidade se comparadas às realizadas sem surfactante.



**Figura 9** - Espectro de emissão do cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  contendo diferentes concentrações dos surfactantes (A) BCTA e (B) Brij-35. Condições: em meio aquoso, ( $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$ ).

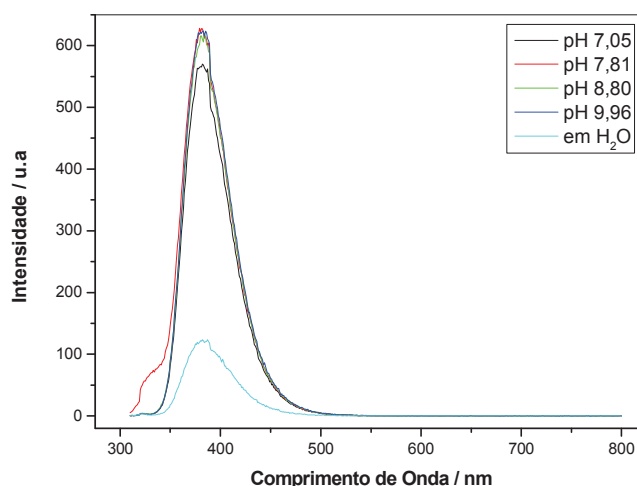
O gráfico referente ao sinal da intensidade de emissão versus a concentração dos surfactantes BCTA e Brij-35 esta representado na Figura 10. Verifica-se que em ambos os surfactantes, a intensidade de fluorescência de cetoconazol aumentou significativamente com o aumento das concentrações dos surfactantes. Avaliou-se o efeito da concentração dos surfactantes até a concentração de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , considerando-se a relação entre a intensidade do sinal de emissão e o consumo dos reagentes. A solubilização de cetoconazol em meio BCTA ou Brij-35 restringe o movimentos das moléculas hóspede, portanto, aumenta a intensidade de fluorescência nativa de cetoconazol. Ambos os surfactante resultaram em melhoria de sensibilidade, porém as medidas realizadas com o surfactante BCTA resultaram em um aumento de 16,11% na intensidade de emissão quando comparado com o Brij-35. Assim a concentração de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  BCTA foi considerada ótima para estudos posteriores.



**Figura 10** - Dependência da intensidade de emissão em função da concentração dos surfactantes (A) BCTA e (B) Brij-35 para detecção de cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $n = 2$ ). Condições: em meio aquoso, ( $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$ ).

A influência do pH do meio reacional sobre o sinal analítico foi avaliada, por meio do estudo de valores de pH na faixa entre 7,05 a 9,96. A Figura 11 apresenta os espectros de soluções de cetoconazol em diferentes pH.

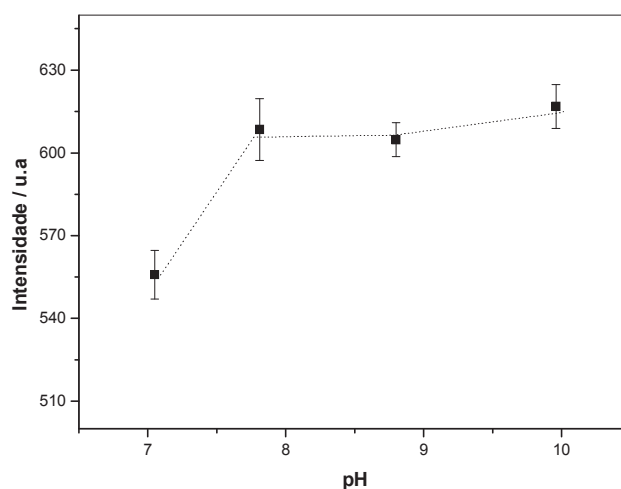




**Figura 11** - Espectro de emissão do cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em diferentes pH na presença de BCTA  $0,10$  mol L<sup>-1</sup>. ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 377$  nm).

O sinal analítico da solução de cetoconazol aumentou significativamente até pH 7,81, permanecendo constante para pH superiores (Figura 12). Isto é devido ao fato de que em soluções ácidas, o cetoconazol existe principalmente na forma (protonado) catiônica. Cátions são excluídos da micelas de BCTA positivamente carregada por causa da interação repulsiva eletrostáticas com grupos trimetilamônio. Em pH maior cetoconazol é desprotonado e pode ser livremente solubilizados em microambiente micelar. Conseqüentemente, a mobilidade das moléculas do cetoconazol dentro das micelas é relativamente restrito, que é acompanhada pelo aumento correspondente na intensidade. Com isso, selecionou-se o pH 8,80 como ótimo para a determinação de cetoconazol.

O resultado apresentado na Figura 12 corresponde aos valores da distribuição das espécies em meio aquoso apresentados na Figura 3. Acima do pH 8,0, a principal espécie química em solução é o cetoconazol desprotonado, responsável pela emissão da fluorescência.



**Figura 12** - Influência do pH na intensidade de emissão do cetoconazol  $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $n = 2$ ) na presença de BCTA  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . ( $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$ ).

#### 4.1.2 Parâmetros de confiabilidade analítica

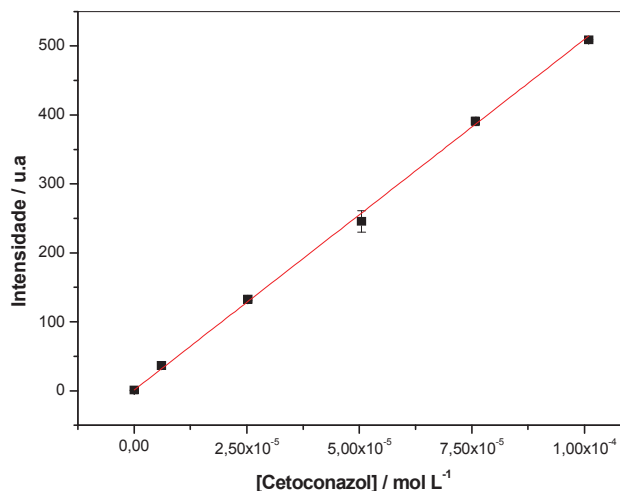
A necessidade de qualidade nos resultados de análises química, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, estão cada vez mais reconhecidas e exigidas, uma vez que dados analíticos não confiáveis ou resultados distorcidos podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros consideráveis. Sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido, existe a necessidade de se averiguar se o método apresenta a performance adequada para as condições nas quais ele será aplicado.

A validação é um processo de averiguação do desempenho de um método analítico, com o intuito de avaliar se este apresenta adequado para as condições nas quais será aplicado. Os resultados da validação indicarão a possibilidade de aplicação do procedimento, do seu propósito e/ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito.

Os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade, precisão, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.

Depois de otimizado os parâmetros químicos, obteve-se a curva analítica, com a finalidade de se verificar a faixa linear entre a intensidade de emissão e a concentração de cetoconazol. O procedimento proposto apresentou uma faixa linear variando de  $1,01 \times 10^{-8}$  a  $1,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . A curva analítica pode ser descrita pela equação  $I = 1,08 + 5,08 \times 10^6 \times C$ ; r

= 0,998, onde  $I$  é intensidade de emissão,  $C$  é a concentração de cetoconazol, em  $\text{mol L}^{-1}$ , e  $r$  é o coeficiente de correlação linear. A Figura 13 apresenta a curva analítica para a determinação de cetoconazol.



**Figura 13** - Curva analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto ( $n = 3$ ). Condições: em pH 8,80 na presença de BCTA 0,10 mol L<sup>-1</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 375 \text{ nm}$ ).

Os parâmetros de confiabilidade avaliados, limite de detecção ( $3\sigma_{\text{branco}}$ /inclinação da curva analítica), limite de quantificação e faixa linear do método proposto, são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Parâmetros de confiabilidade do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de cetoconazol

|  |   |
|--|---|
| Limite de Detecção ( $3\sigma_{\text{branco}}$ )       | $1,83 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ( $97,49 \mu\text{g L}^{-1}$ ) |
| Limite de Quantificação ( $10\sigma_{\text{branco}}$ ) | $6,18 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$                                |
| Faixa Linear   | $1,01 \times 10^{-8}$ a $1,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$        |

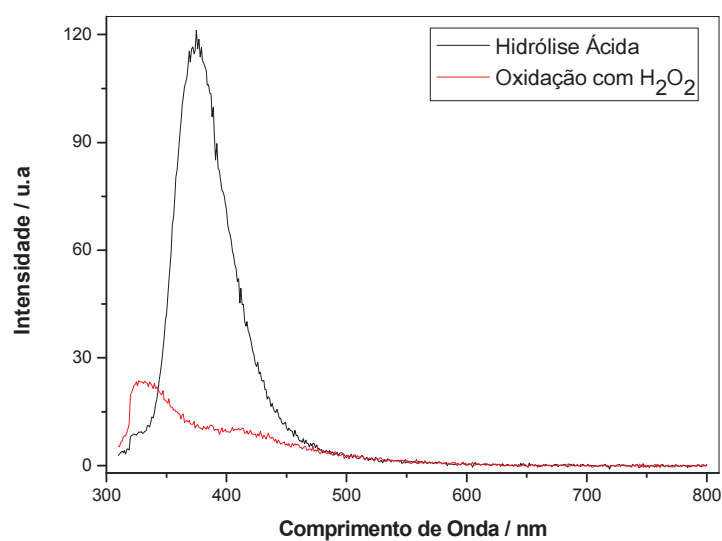
#### **4.1.3 Efeito dos interferentes produzidos pela hidrólise ácida e oxidação do cetoconazol sobre a intensidade de emissão**

O efeito dos produtos de degradação de uma solução padrão de cetoconazol foi investigada na determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto. Os produtos da hidrólise ácida do cetoconazol foram obtidos pela reação de uma solução padrão de cetoconazol  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  mantida sob refluxo por 30 minutos. O efeito dos produtos da hidrólise sobre a intensidade de emissão foi estimado, avaliando-se a recuperação de uma solução padrão de cetoconazol em uma solução contendo uma concentração teórica dos produtos da hidrólise de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

No caso da hidrólise ácida, verificou-se uma diminuição no sinal de emissão de 5%, indicando pequena extensão da degradação do cetoconazol. Porém, uma recuperação de 83,9% foi obtida, indicando interferência do produto degradado originado pelo tratamento da solução na determinação de cetoconazol.

Os produtos de degradação do cetoconazol por oxidação foram obtidos após tratamento de uma solução padrão de cetoconazol  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e 1 mL de peróxido de hidrogênio (35% m/m) mantido em refluxo por 30 minutos. O efeito dos produtos da oxidação do cetoconazol sobre a determinação de cetoconazol foi avaliado da mesma maneira que os produtos da hidrólise ácida. Verificou-se um decréscimo de aproximadamente 91% na intensidade de emissão do cetoconazol, indicando a degradação do cetoconazol com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ainda, uma recuperação de 87,2% de cetoconazol adicionado foi verificada, indicando que o produto da decomposição por oxidação interfere na determinação do cetoconazol empregando o procedimento proposto, na concentração teórica avaliada.

A Figura 14 apresenta os espectros de emissão do produto de degradação do cetoconazol.



**Figura 14** - Espectro de emissão do produto de degradação do cetoconazol  $2,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de BCTA  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 288 \text{ nm}$ .

**Tabela 6** - Estudo da interferência dos produtos de degradação

| Procedimento    | Adicionado/ $10^{-5} \text{ mol/L}$ | Recuperado/ $10^{-5} \text{ mol/L}$ | Recuperação/ % |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Hidrólise ácida | 4,12                                | $3,47 \pm 0,12$                     | 83,9           |
| Oxidação        | 4,12                                | $3,59 \pm 0,01$                     | 87,2           |

n = 3; Média  $\pm$  Desvio Padrão

#### 4.1.4 Estudo de recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas e amostras de água de rio empregando o procedimento proposto

No teste de recuperação do analito, duas concentrações diferentes de solução de referência de cetoconazol foram adicionadas a soluções de amostras farmacêuticas contendo uma concentração de cetoconazol de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Estudo da recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas comerciais

| Amostra           | Cetoconazol / mol L <sup>-1</sup> |                           | Recuperação / % |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------|
|                   | Adicionado                        | Encontrado <sup>(a)</sup> |                 |
| A<br>(comprimido) | 2,04x10 <sup>-5</sup>             | 1,95x10 <sup>-5</sup>     | 95,7            |
|                   | 4,08x10 <sup>-5</sup>             | 3,66x10 <sup>-5</sup>     | 90,0            |
| B<br>(comprimido) | 2,06x10 <sup>-5</sup>             | 1,94x10 <sup>-5</sup>     | 94,5            |
|                   | 4,12x10 <sup>-5</sup>             | 4,04x10 <sup>-5</sup>     | 98,1            |
| C<br>(shampoo)    | 2,06x10 <sup>-5</sup>             | 1,54x10 <sup>-5</sup>     | 76,9            |
|                   | 4,12x10 <sup>-5</sup>             | 3,36x10 <sup>-5</sup>     | 81,7            |
| D<br>(suspensão)  | 2,01x10 <sup>-5</sup>             | 1,77x10 <sup>-5</sup>     | 88,3            |
|                   | 4,02x10 <sup>-5</sup>             | 3,30x10 <sup>-5</sup>     | 82,1            |
| E<br>(spray)      | 2,01x10 <sup>-5</sup>             | 1,76x10 <sup>-5</sup>     | 87,7            |
|                   | 4,02x10 <sup>-5</sup>             | 3,05x10 <sup>-5</sup>     | 76,0            |

n = 2; Média±Desvio Padrão

Podemos verificar a influência da matriz de amostras na determinação de cetoconazol nas formulações C a E devido a baixo valor de recuperação (76 a 88,3%). Nestes casos a determinação será realizada empregando-se o método de adição múltipla de padrão. As formulações farmacêuticas A e B apresentaram uma menor interferência da matriz de amostra, sendo assim a concentração de cetoconazol foi determinada utilizando o método de adição múltipla de padrão.

A aplicabilidade do procedimento proposto também foi investigada para a determinação de cetoconazol em amostras de água de rio. Recuperações de diferentes quantidades de cetoconazol adicionados em amostras de água do rio Dourados (MS) foram determinadas e são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Estudo da recuperação de cetoconazol em amostras de água de rio

| Amostra  | Cetoconazol / mol L <sup>-1</sup> |                       | Recuperação/% |
|----------|-----------------------------------|-----------------------|---------------|
|          | Adicionado                        | Encontrado            |               |
| <b>A</b> | 1,01x10 <sup>-5</sup>             | 1,04x10 <sup>-5</sup> | 103           |
|          | 1,01x10 <sup>-4</sup>             | 9,48x10 <sup>-5</sup> | 93,8          |
| <b>B</b> | 1,01x10 <sup>-5</sup>             | 9,76x10 <sup>-6</sup> | 96,7          |
|          | 1,01x10 <sup>-4</sup>             | 9,54x10 <sup>-5</sup> | 94,4          |

n = 3

Nas amostras de águas, a recuperação do cetoconazol variou entre 93,8 a 103 %, indicando que o procedimento proposto é adequado para determinação do analito em amostras de águas.

#### 4.1.5 Aplicação

O procedimento proposto foi aplicado na determinação de cetoconazol em 5 formulações comerciais disponíveis. A Tabela 9 apresenta os teores rotulados, encontrados empregando-se o procedimento desenvolvido por VOJIC e colaboradores[51] e os teores encontrados empregando-se o procedimento proposto. Aplicando-se o teste *t-pareado*, verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos utilizando-se os dois procedimentos a um nível de confiança de 95%. Pode-se verificar que as amostras de C a E apresentaram um maior erro relativo quando comparada ao procedimento proposto. Vale ressaltar que o procedimento comparativo baseia-se na determinação espectrofotométrica do cetoconazol, sendo validado para formulações farmacêuticas na forma de comprimidos.

**Tabela 9** - Determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas

| Amostra | Rotulado                    | Encontrado |                                      | $E_r^{(b)}$ |
|---------|-----------------------------|------------|--------------------------------------|-------------|
|         |                             | UV-vis     | Procedimento proposto <sup>(a)</sup> |             |
| A       | 695,4 mg g <sup>-1</sup>    | 650,0      | 622,4 ± 0,95                         | -4,3        |
| B       | 539,2 mg g <sup>-1</sup>    | 493,0      | 504,2 ± 1,04                         | 2,3         |
| C       | 20,0 mg mL <sup>-1</sup>    | 21,2       | 23,0 ± 0,03                          | 8,5         |
| D       | 20,0 g 100 mL <sup>-1</sup> | 14,9       | 21,45 ± 1,00                         | 44          |
| E       | 2,0 g 100 mL <sup>-1</sup>  | 1,90       | 3,08 ± 0,072                         | 62          |

<sup>(a)</sup> Média ± Desvio Padrão

<sup>(b)</sup> Procedimento proposto vs. Procedimento comparativo.

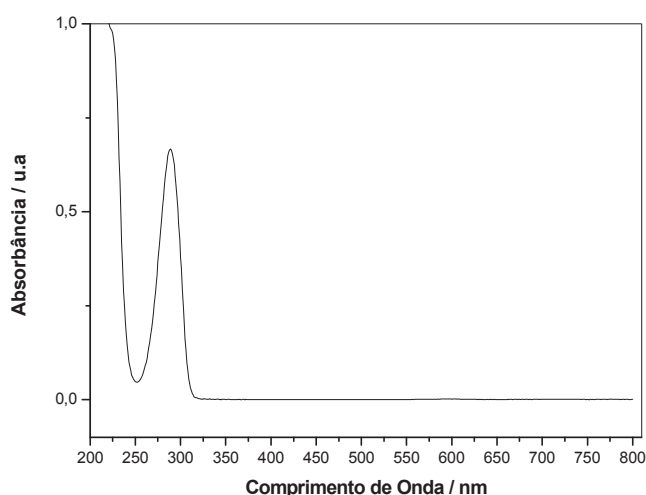
$t_{calculado} = 0,21$ ;  $t_{crítico} = 2,77$

#### 4.2 Desenvolvimento de um procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em amostras de interesse alimentício

Inicialmente, com objetivo de avaliar o perfil de absorção da molécula de TBHQ na região ultravioleta do espectro eletromagnético, obteve-se o espectro de absorção de uma solução padrão de TBHQ  $1,76 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

O espectro da solução de TBHQ em meio etanol e água destilada foi obtido entre 200 e 800 nm. Água destilada foi utilizada como branco nas leituras. O espectro de absorção é apresentado na Figura 15.



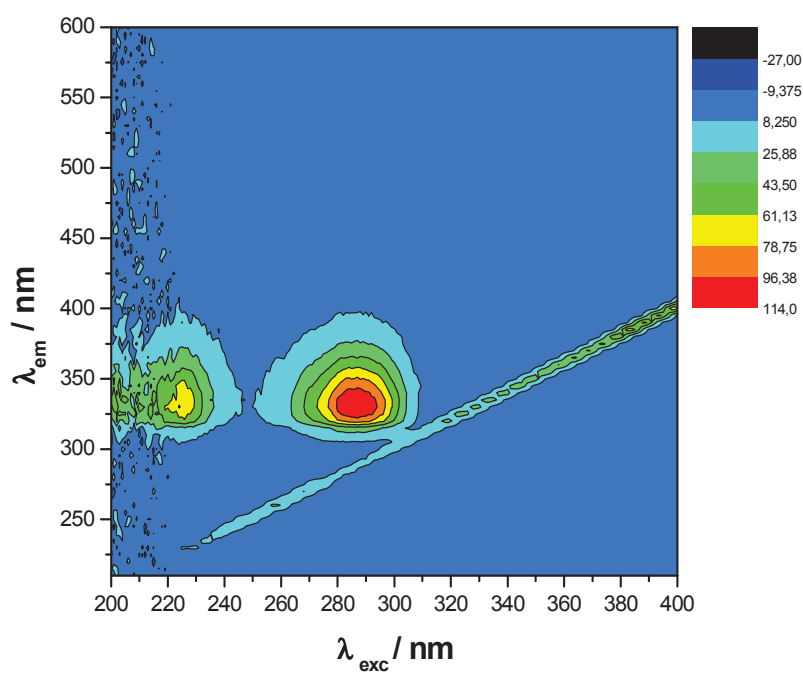


**Figura 15** - Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis da solução de TBHQ  $1,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio aquoso.

Considerando que a solução de TBHQ absorve energia na região do ultravioleta passou-se à etapa seguinte, em que matriz de excitação-emissão foi construída para se avaliar o melhor comprimento de onda a ser usado para excitação.

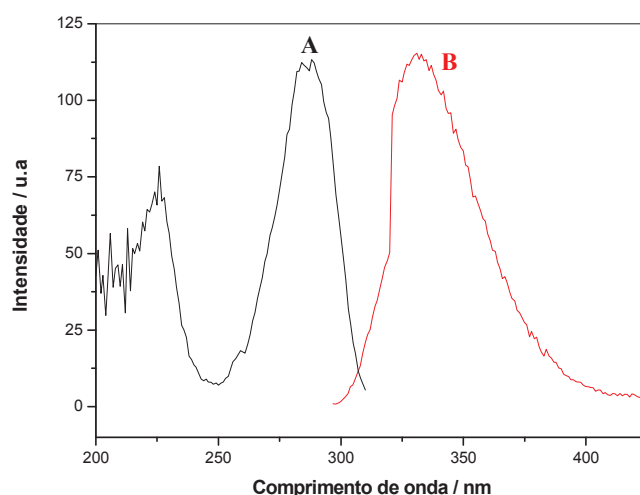
#### **4.2.1 Definição do comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) utilizando matriz de excitação-emissão (EEM)**

A definição do melhor comprimento de onda a ser utilizado para a excitação do TBHQ foi realizada através de análises de matriz de excitação-emissão. Para construção dos diagramas de superfície apresentado na Figura 16, foi traçado espectro de emissão variando-se o  $\lambda_{\text{ex}}$  200 a 400 nm, com incrementos de 5 nm. A varredura do monocromador de emissão foi de 210 a 600 nm com intervalos de 5 nm.



**Figura 16** - Diagrama de superfície correspondente à intensidade de emissão da solução de TBHQ  $1,71 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Pelo diagrama construído na EEM foi possível observar um perfil completo de emissão do TBHQ, relacionado aos comprimentos de onda de excitação. Sendo assim, o comprimento de onda de excitação de 287 nm produziu a maior intensidade de emissão que ocorreu em 335 nm. A Figura 17 apresenta o espectro de excitação e emissão de TBHQ  $1,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 17** - Espectro de (A) excitação e (B) emissão do TBHQ  $1,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 335 \text{ nm}$ .

#### 4.2.2 Planejamento fatorial

A análise multivariada vem sendo amplamente utilizada para identificar as variáveis que exercem maiores influências no desempenho de um determinado processo. Planejamentos fatoriais estão relacionados ao planejamento de experimentos que possibilitem a medida dos efeitos de determinados fatores sobre a resposta, levando-se em conta um número total de experimentos consideravelmente reduzido[53].

Com o objetivo de maximizar o sinal de emissão do TBHQ, um planejamento experimental com análise de superfície de resposta foi realizado para investigar interações relevantes entre fatores. A partir desta avaliação foi possível fazer um ajuste das condições experimentais e obter uma avaliação preliminar da robustez da resposta analítica em relação a cada um dos fatores.

Para obtenção de uma melhor resposta analítica, a triagem das variáveis envolvidas foi feita a partir de um planejamento  $2^2$ , nas quais as variáveis de interesse foram: pH e a concentração dos surfactantes (Brij-35, BCTA e DSS). Este planejamento foi realizado em condições experimentais definidas, preliminarmente em dois níveis alto (+) e baixo (-), conforme matriz de planejamento apresentada na Tabela 3.

Os cálculos dos efeitos foram realizados empregando planilha do Excel disponibilizada por Teófilo e colaboradores[54]. As análises dos efeitos indicaram que os

parâmetros químicos avaliados apresentaram efeitos significativos a um nível de confiança de 95%.

A resposta do sistema químico (emissão) é descrita conforme a equação abaixo:

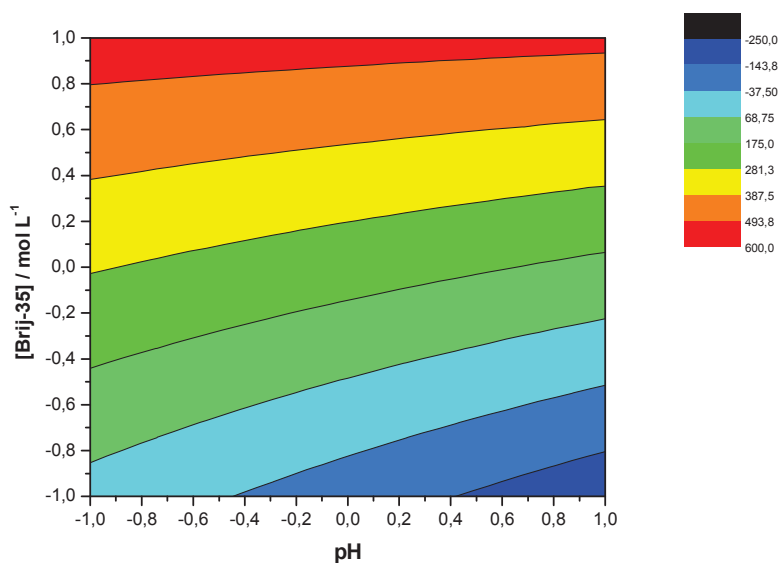
$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times (x) + \beta_2 \times (y) + \beta_{12} \times (x) \times (y)$$

Na equação os valores  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  indicam a média de todas as respostas obtidas, o efeito dos parâmetros pH e concentração do surfactante, respectivamente, sobre a resposta do sistema. O coeficiente  $\beta_{12}$  indica a interação entre os efeitos pH e concentração dos surfactantes estudados.

A Figura 18 representa a visualização do principal efeito da concentração do surfactante Brij-35 e pH sobre a intensidade emissão do TBHQ, considerando um nível de 95% de confiança. O modelo matemático que descreve o comportamento da emissão de acordo com os parâmetros químicos obtido é descrito conforme equação abaixo:

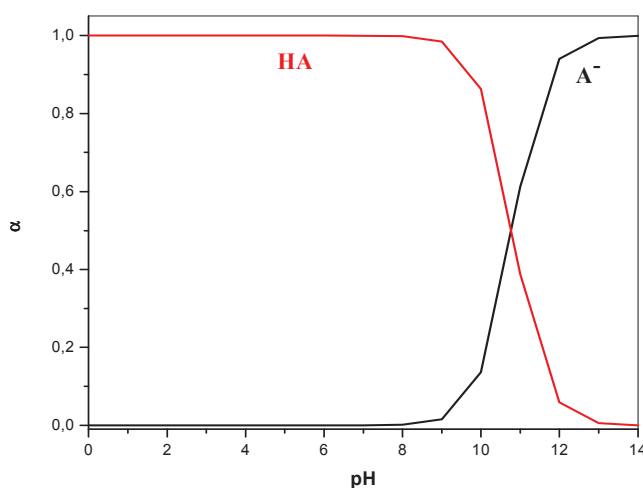
$$Y = 220,88 - 69,16 \times (x) + 312,49 \times (y) + 54,31 \times (x) \times (y)$$

Pode se verificar que o efeito do pH é negativo, quando o valor passa do nível -1 para o nível +1. O efeito da concentração de Brij-35 é de +312,49, isto indica que à medida que a concentração aumenta, seu efeito sobre a intensidade de emissão é positiva.



**Figura 18** – Estudo da influência do surfactante Brij-35 vs. pH sobre a intensidade de emissão. ( $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 332 \text{ nm}$ ).

Verifica que o melhor sinal analítico é obtido quando há um aumento no valor da concentração do surfactante Brij-35. Este comportamento provavelmente deve-se a solubilização de TBHQ, em pH menores que 11, no interior das micelas formadas restringindo o movimento das moléculas hóspede. Este processo resulta no aumento da intensidade de emissão do TBHQ. O pH da solução tem menor influência na intensidade de emissão. Pelo gráfico de distribuição das espécies (Figura 19) de TBHQ, observa que em soluções em pH menores que 11, a principal espécie do TBHQ existe está na forma não iônica, em pH maior TBHQ é desprotonado. Como Brij-35 é uma molécula neutra, em pH baixo TBHQ pode ser livremente solubilizado.



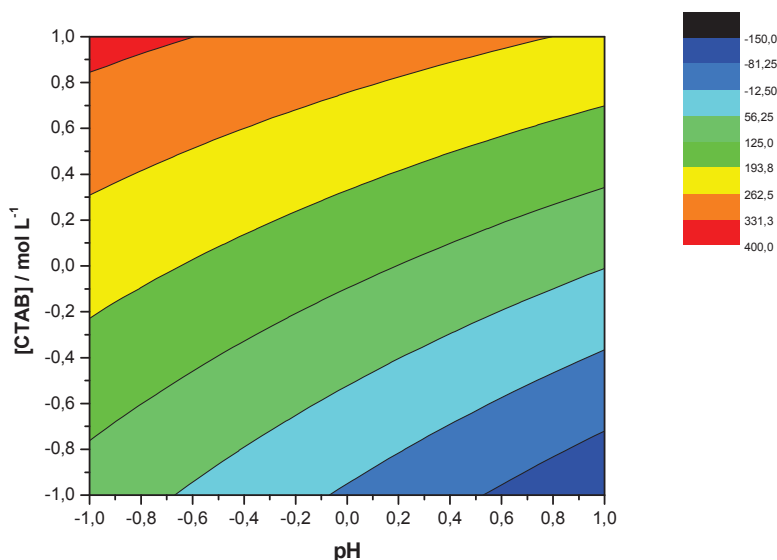
**Figura 19 – Gráfico da distribuição das espécies de TBHQ em função do pH.**

O aumento da concentração de BCTA ocasiona também efeitos significativos na intensidade de emissão do TBHQ ( $\beta_2 = 161,33$ ), porém maior intensidade é obtida em baixos valores de pH ( $\beta_1 = -82,87$ ), conforme ilustrada na Figura 20. A curva de superfície de resposta foi construída de acordo com os valores dos efeitos principais e de interação entre os parâmetros obtidos e descritos pela equação abaixo:

$$Y = 140,85 - 82,87 \times (x) + 161,33 \times (y) + 33,37 \times (x) \times (y)$$

Na faixa de pH avaliada, nos menores valores de pH, a espécie de TBHQ existentes em solução é a desprotonada ( $A^{2-}$ ). Desta maneira ocorre uma solubilização da espécie nas micelas do surfactante catiônico. No valor de pH mais elevado, ocorre uma diminuição da

intensidade de emissão, provavelmente devido ao aumento da força iônica do meio reacional. Desta maneira, os íons  $\text{OH}^-$ , associados ao BCTA, impediriam a solubilização do TBHQ ( $\text{A}^{2-}$ ) em seu interior.

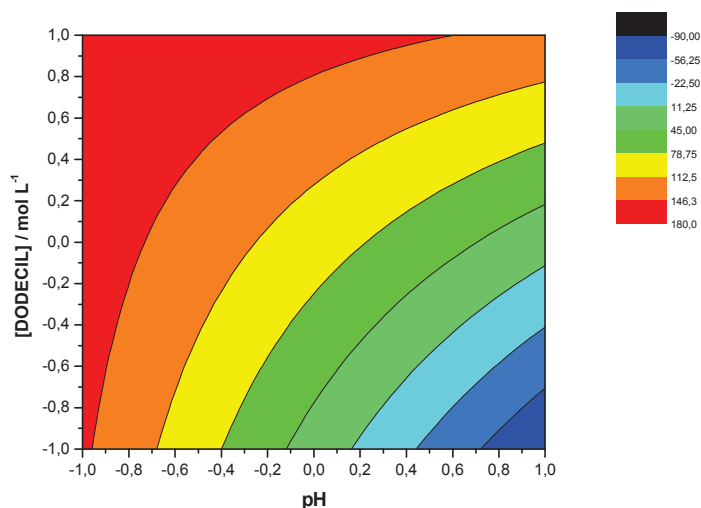


**Figura 20** - Estudo da influência do surfactante BCTA vs. pH sobre a intensidade de emissão.  $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 332 \text{ nm}$ .

Ao contrário dos outros surfactantes citados acima, a concentração do surfactante DSS teve menor influência sobre a intensidade de emissão de TBHQ, como pode ser observada pela equação que descreve a variação da intensidade de emissão de acordo com a variação dos parâmetros avaliados:

$$Y = 94,26 - 72,46 \times (x) + 62,81 \times (y) + 48,29 \times (x) \times (y)$$

Na Figura 21, verifica-se que em pH menores ocorre um aumento na intensidade de emissão. O fato deve-se que em soluções básicas, TBHQ existe principalmente na forma desprotonada. Ânions são excluídos da micelas de DSS negativamente carregada por causa da interação repulsiva eletrostáticas com grupos sulfato. Em pH menor o TBHQ esta totalmente protonado e pode ser livremente solubilizados em microambiente micelar. Conseqüentemente, a mobilidade de moléculas de TBHQ dentro das micelas é relativamente restrita, que é acompanhada pelo aumento correspondente na intensidade.



**Figura 21** – Estudo da influência do surfactante DSS vs. pH sobre a intensidade de emissão.

$\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 332 \text{ nm}$ .

#### 4.2.3 Estudo da concentração do Brij-35 e pH

Como os resultados no teste preliminar utilizando o surfactante Brij-35 mostraram-se satisfatórios, deu-se início a um estudo da influência da concentração do Brij-35 e pH sobre a intensidade de emissão do TBHQ. Diversas soluções contendo diferentes concentrações de Brij-35 foram testadas para a resposta do TBHQ, a saber:  $5,01 \times 10^{-2}$ ,  $5,01 \times 10^{-3}$  e  $5,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente nível -1, 0 e +1. Os valores avaliados foram 2,0, 7,0 e 11 (níveis -1, 0 e +1, respectivamente). Os valores de intensidade de emissão em função da concentração do Brij-35 e pH são apresentados na Tabela 10.

Com os resultados, obtemos uma equação que descreve a influência dos fatores avaliados sobre a intensidade de emissão do cetozonazol:

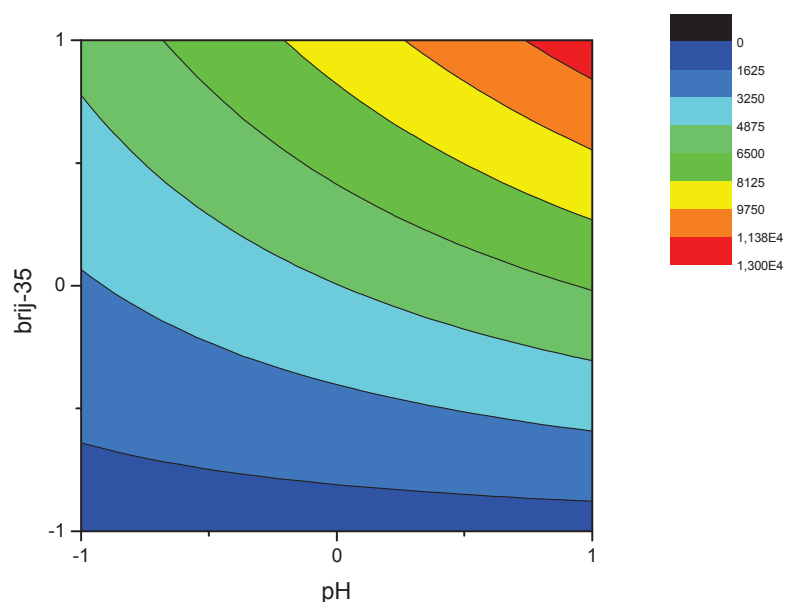
$$Y = 362 - 68,4 \times (x) + 426,3 \times (y) + 83,35 \times (x) \times (y)$$

Onde Y é a intensidade de emissão, X é o fator pH e y o fator concentração de Brij-35. Verificamos, que quando passamos do nível -1 para o +1 do pH, ocorre um pequeno incremento da intensidade de emissão. Quando aumenta-se a concentração de Brij-35 do nível -1 para +1, ocorre um incremento da intensidade de emissão. O efeito do aumento simultâneo dos fatores de -1 a +1 promove um aumento na intensidade de emissão, verificado pela constante de 83,35.

Na Figura 22, apresenta-se a influência dos fatores na intensidade de emissão do TBHQ, avaliando-se uma faixa de pH menor que a apresentada na Figura 18. Desta maneira, selecionou-se um pH de 2,0 para quantificação de TBHQ empregando o procedimento proposto.

**Tabela 10** - Efeito da concentração do surfactante Brij-35 e pH sobre a emissão do TBHQ

| pH   | Concentração Brij-35/ mol L <sup>-1</sup> |                       |                       |
|------|---|-----------------------|-----------------------|
|      | 5,01x10 <sup>-2</sup>                     | 5,01x10 <sup>-3</sup> | 5,01x10 <sup>-5</sup> |
| 2,0  | 494 ± 5,2                                 | -                     | 155 ± 0,4             |
| 7,0  | -   | 457,9 ± 10,5          | -                     |
| 11,0 | 504 ± 13                                  | -                     | 4,3 ± 1,3             |

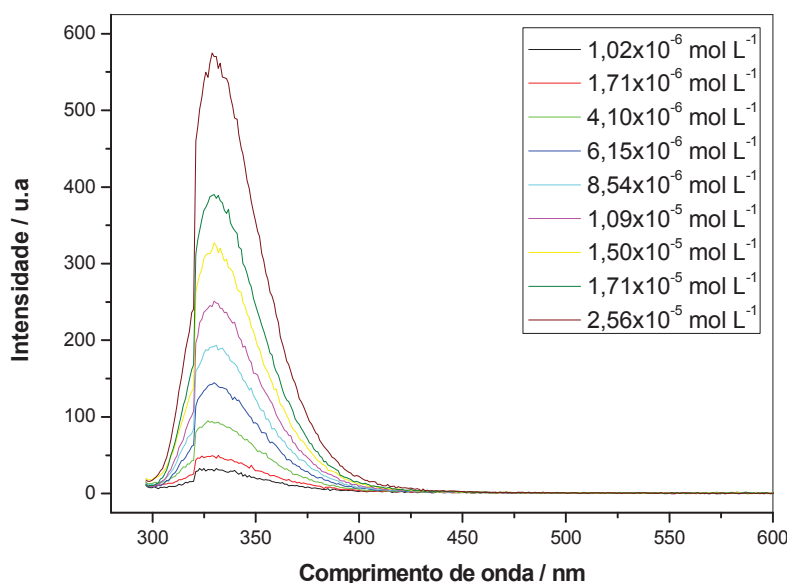


**Figura 22** - Estudo da influência do surfactante Brij-35 vs. pH sobre a intensidade de emissão.  $\lambda_{ex} = 287 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 332 \text{ nm}$ .



#### 4.2.4 Parâmetros de confiabilidade analítica

Utilizando os parâmetros químicos previamente otimizados, foi avaliado a linearidade do procedimento espectrofluorimétrico, monitorando-se o sinal de emissão de diferentes soluções padrão do antioxidante. A Figura 23 apresenta os espectros de emissão obtidos em nove concentrações de TBHQ no intervalo de  $1,02 \times 10^{-6}$  a  $2,56 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 23** - Espectro de emissão de soluções padrão de TBHQ. Meio contendo pH 2,09 e Brij-35  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\text{ex}} = 287$  nm.

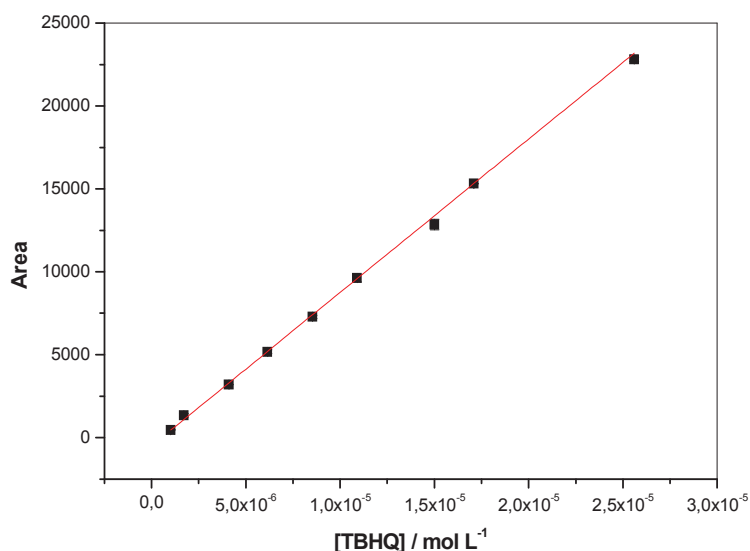
Com a finalidade de avaliar a melhor maneira de obter a linearidade do procedimento proposto, estudou-se diferentes formas de tratamaneto do espectro emissão que são descritas a seguir. Obtiveram-se os sinais para cada solução empregando a área da curva do espectro de emissão (método A), magnitude da intensidade de emissão, independente do  $\lambda_{\text{em}}$  (método B) e a magnitude da intensidade de emissão no  $\lambda_{\text{em}}$  de 331 nm (método C).

Tabela 11 mostra a equação que descreve as retas e os coeficientes de regressão linear encontrados para o procedimento proposto. Como é possível observar o sinal que foi obtido através da área da curva do espectro de emissão (método A) apresentou maior sensibilidade (inclinação =  $9,24 \times 10^8$ ). A partir deste parâmetro optou-se em obter o sinal por meio da área da curva do espectro de emissão.

**Tabela 11** – Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de TBHQ

| Método | Equação da curva analítica                 | R      |
|--------|--|--------|
| A      | $A = - 485,35 + 9,24 \times 10^8 \times C$ | 0,9999 |
| B      | $I = - 11,72 + 2,21 \times 10^7 \times C$  | 0,9999 |
| C      | $I = - 5,79 + 2,18 \times 10^7 \times C$   | 0,9999 |

A partir dos valores da área da curva do espectro de emissão, construiu-se a curva analítica que é apresentada na Figura 24, cada ponto representa a média de duas medidas experimentais.



**Figura 24** – Dependência da área do espectro de emissão em função da concentração de TBHQ. Condições: em pH 2,09 na presença de Brij-35  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$ ).

O limite de detecção foi de  $8,37 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , indicando detectabilidade aceitável quando comparado com procedimento descritos na literatura (Tabela 2), o que viabiliza a utilização da técnica no desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico para quantificação de TBHQ em amostras de interesse alimentício.

#### **4.2.5 Estudo de recuperação de TBHQ em amostras de creme vegetal, margarina, maionese e óleo vegetal**

A avaliação da recuperação de TBHQ nas amostras foi realizada empregando-se cinco produtos disponíveis comercialmente. O estudo foi realizado adicionando-se alíquotas de solução de referência de TBHQ a uma solução da amostra, obtendo-se assim três concentrações finais de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-6}$ ,  $8,50 \times 10^{-6}$  e  $2,50 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A porcentagem de recuperação do analito nas amostras foi obtida comparando-se a resposta da solução na qual se adicionou a solução padrão com o sinal analítico da solução de amostra sem a adição das soluções padrão. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 12.

Os valores de recuperação variaram entre 84,7 a 109 %, indicando que as matrizes de amostras avaliadas não interferem na determinação de TBHQ empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto.

**Tabela 12** - Estudo da recuperação de TBHQ em amostra comerciais

| Amostra              | TBHQ / mol L <sup>-1</sup> |  | Recuperação (%) |
|----------------------|----------------------------|--|-----------------|
|                      | Adicionado                 | Encontrado                                   |                 |
| A<br>(creme vegetal) | 1,05x10 <sup>-6</sup>      | 1,09x10 <sup>-6</sup> ±7,63x10 <sup>-8</sup> | 104             |
|                      | 8,89x10 <sup>-6</sup>      | 9,73x10 <sup>-6</sup> ±2,12x10 <sup>-9</sup> | 109             |
|                      | 2,47x10 <sup>-5</sup>      | 2,47x10 <sup>-5</sup> ±7,15x10 <sup>-7</sup> | 100             |
| B<br>(margarina)     | 1,24x10 <sup>-6</sup>      | 1,05x10 <sup>-6</sup> ±3,22x10 <sup>-7</sup> | 84,7            |
|                      | 8,43x10 <sup>-6</sup>      | 8,05x10 <sup>-6</sup> ±2,12x10 <sup>-8</sup> | 95,5            |
|                      | 2,34x10 <sup>-5</sup>      | 2,10x10 <sup>-5</sup> ±2,12x10 <sup>-7</sup> | 90,60           |
| C<br>(margarina)     | 1,20x10 <sup>-6</sup>      | 1,15x10 <sup>-6</sup> ±7,07x10 <sup>-9</sup> | 95,8            |
|                      | 8,62x10 <sup>-6</sup>      | 9,39x10 <sup>-6</sup> ±2,37x10 <sup>-7</sup> | 109             |
|                      | 2,45x10 <sup>-5</sup>      | 2,22x10 <sup>-5</sup> ±1,67x10 <sup>-7</sup> | 90,6            |
| D<br>(maionese)      | 1,24x10 <sup>-6</sup>      | 1,24x10 <sup>-6</sup> ±2,28x10 <sup>-8</sup> | 100             |
|                      | 8,44x10 <sup>-6</sup>      | 8,51x10 <sup>-6</sup> ±2,16x10 <sup>-7</sup> | 101             |
|                      | 2,44x10 <sup>-5</sup>      | 2,12x10 <sup>-5</sup> ±1,92x10 <sup>-7</sup> | 87,2            |
| E<br>(óleo de soja)  | 9,64x10 <sup>-7</sup>      | 1,02x10 <sup>-6</sup> ±1,41x10 <sup>-8</sup> | 105             |
|                      | 8,55x10 <sup>-6</sup>      | 8,42x10 <sup>-6</sup> ±7,85x10 <sup>-8</sup> | 98,5            |
|                      | 2,37x10 <sup>-5</sup>      | 2,54x10 <sup>-5</sup> ±7,99x10 <sup>-8</sup> | 107             |

n = 3

## **5. CONCLUSÕES**

---

O método proposto, utilizando a técnica espectroscopia de luminescência molecular mostrou-se seletivo, linear e exato para a determinação de cetoconazol e TBHQ.

A aplicação do método analítico possibilitou a quantificação de cetoconazol e TBHQ em amostras ambientais, alimentícias e farmacêuticas e mostrou-se de fácil implementação, sem a necessidade de tratamento laborioso da amostra.

O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação de cetoconazol nas amostras, para as amostras contendo cetoconazol as recuperações variaram entre 76,0-103,2%, enquanto que para as amostras de TBHQ obtiveram-se recuperações entre 84,7-109%. Avaliando os parâmetros de validação, foi possível verificar que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada na análise das amostras.

A grande vantagem do método proposto para a determinação de cetoconazol e TBHQ por fluorescência é a não necessidade de tratamento laboriosos da amostra antes da análise. Outra característica importante é o fato de que não há necessidade de serem utilizados outros reagentes cromóforos e solventes além da água, pois o analito é altamente fluorescente, estando de acordo com os princípios pelos quais a mesma pode ser inserida na nova tendência da química analítica, a química verde.

## **6. REFERÊNCIAS**

---

1. Bila, D.M. e Dezotti, M., *Fármacos no meio ambiente*. Química Nova, 2003. **26**: p. 523-530.
2. Melo, S.A.S., Trovó, A.G., Bautitz, I.R., Nogueira, R.F.P., *Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados*. Química Nova, 2009. **32**: p. 188-197.
3. Dantas, A.N.S., de Souza, D., de Lima, J.E.S., de Lima-Neto, P., Correia, A.N., *Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(28): p. 9083-9089.
4. Ferrari, B.t., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003. **55**(3): p. 359-370.
5. Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.-D., Silvana Vianna, R., Baumann, W., *Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil*. Science of The Total Environment, 1999. **225**(1-2): p. 135-141.
6. Valcarcel, Y., Alonso, S.G., Rodriguez-Gil, J.L., Maroto, R.R., Gil, A., Catala, M., *Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain*. Chemosphere, 2011. **82**(7): p. 1062-71.
7. Heberer, T., *Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water*. Journal of Hydrology, 2002. **266**(3-4): p. 175-189.
8. MIRJANA, P.V., GORDANA, V.P., DUSAN, M.S., LIDIJA, B.P., *Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets*. Journal of the Serbian Chemical Society. **70**.
9. Skiba, M., Skiba-Lahiani, M., Marchais, H., Duclos, R., Arnaud, P., *Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations*. International journal of pharmaceutics, 2000. **198**(1): p. 1-6.
10. Santos, J.L., Ribeiro, Y., Salgado, H., Chung, M.C., *Estudo de metodologia analítica para determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas*.
11. Farhadi, K. e Maleki, R., *A new spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on the oxidation reactions*. Analytical Sciences, 2001. **17**(i867).
12. Staub, I., Cruz, Á.S., Pinto, T.d.J.A., Schapoval, E.E.S., Bergold, A.M., *Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007. **43**(2): p. 301-307.
13. Viçosa, A.L., Villa, A.L.V., Falcão, D.Q., Teixeira, D.F., Soares, K.C.C., Berrondo, L.F., de Oliveira Ramos, M., de M Filho, R.F.W., da Silva Ticom, T.T., *Estudo da utilização de incrementadores de dissolução para compressão direta: enfoque no desenvolvimento de medicamentos genéricos*. 2003, Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2003.125 p.
14. Beigi, F.A.K., Imani, M., Payehghadr, M., Hosseini, H., *SPE-HPLC method for determination of ketoconazole and clotrimazole residues in cow's milk*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2011. **22**: p. 1679-1685.
15. Jalali, F. e Afshoon, A., *Spectrofluorimetric Study and Detection of Ketoconazole in the Presence of  $\beta$ -cyclodextrin*. Journal of fluorescence, 2008. **18**(1): p. 219-225.
16. Arranz, P., Arranz, A., Moreda, J.M., amp, x, Cid, A., Arranz, J.F., *Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **33**(4): p. 589-596.



17. Shamsipur, M. e Farhadi, K., *Adsorptive stripping voltammetric determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations and urine using carbon paste electrodes*. Analyst, 2000. **125**(9): p. 1639-1643.
18. Shamsipur, M. e Farhadi, K., *Electrochemical behavior and determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations*. Electroanalysis, 2000. **12**(6): p. 429-433.
19. Jalali, F., Afshoon, A., Shamsipur, M., *Micellar-enhanced spectrofluorimetric determination of ketoconazole in cetyltrimethylammonium bromide medium*. Chemia analityczna, 2007. **52**(1): p. 115-123.
20. Khashaba, P., El-Shabouri, S., Emara, K., Mohamed, A., *Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000. **22**(2): p. 363-376.
21. Rane, S.S. e Padmaja, P., *Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011.
22. Velikinac, I., Čudina, O., Janković, I., Agbaba, D., Vladimirov, S., *Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations*. Il Farmaco, 2004. **59**(5): p. 419-424.
23. Vertzoni, M., Reppas, C., Archontaki, H., *Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of ketoconazole in canine plasma*. Journal of Chromatography B, 2006. **839**(1): p. 62-67.
24. Xia, Y., Zhi, X., Wang, X., Chen, M., Cheng, J., *Ultrasound-enhanced surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for determination of ketoconazole and econazole nitrate in human blood*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012: p. 1-7.
25. Ding, M. e Zou, J., *Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils*. Food chemistry, 2011.
26. Ramalho, V.C. e Jorge, N., *Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos*. Química Nova, 2006. **29**(4): p. 755.
27. Teixeira Filho, J. e Godoy, H.T., *Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos Vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por clae/uV*. Quim. Nova, 2009. **32**(5): p. 1189-1194.
28. Yang, M.H., Lin, H.J., Choong, Y.M., *A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats*. Food research international, 2002. **35**(7): p. 627-633.
29. Ravelli, D., *Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial*. 2011.
30. Borsato, D., Maia, E.C.R., Dall'Antonia, L.H., Silva, H.C.d., Pereira, J.L., *Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: determinação do tempo de estocagem*. Química Nova, 2012. **35**: p. 733-737.
31. Guan, Y., Chu, Q., Fu, L., Ye, J., *Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 2005. **1074**(1-2): p. 201-204.
32. Wu, H.Z., Guo-Yan Du, Li-Ming, *Determination of ofloxacin and gatifloxacin by mixed micelle-mediated cloud point extraction-fluorimetry combined methodology*.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **75**(5): p. 1624-1628.
33. Takemoto, E., Teixeira Filho, J., Godoy, H.T., *Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV*. Química Nova, 2009. **32**: p. 1189-1194.
  34. Tormin, T.F., Gimenes, D.T., Silva, L.G., Ruggiero, R., Richter, E.M., Ferreira, V.S., Muñoz, R.A.A., *Direct amperometric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel*. Talanta, 2010. **82**(4): p. 1599-1603.
  35. de Araújo, T.A., Barbosa, A.M.J., Viana, L.H., Ferreira, V.S., *Voltammetric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **79**(2): p. 409-414.
  36. de Araujo, T.A., Barbosa, A.M.J., Viana, L.H., Ferreira, V.S., *Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples*. Fuel, 2011. **90**(2): p. 707-712.
  37. Caramit, R.P., de Freitas Andrade, A.G., Gomes de Souza, J.B., de Araujo, T.A., Viana, L.H., Trindade, M.A.G., Ferreira, V.S., *A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes*. Fuel, 2013. **105**(0): p. 306-313.
  38. de la Fuente, C., Acuña, J.A., Vázquez, M.D., Tascón, M.L., Sánchez Batanero, P., *Voltammetric determination of the phenolic antioxidants 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone at a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex*. Talanta, 1999. **49**(2): p. 441-452.
  39. dos Santos Raymundo, M., Marques da Silva Paula, M., Franco, C., Fett, R., *Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques*. LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(7): p. 1133-1139.
  40. González-Cortés, A., Armisén, P., Asunción Ruiz, M., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., *Electroanalytical study of the antioxidant tert-butylhydroquinone (TBHQ) in an oil-in-water emulsified medium*. Electroanalysis, 2005. **6**(11-12): p. 1014-1019.
  41. Anízio M. Faria, Maria Eliana L.R. Queiroz, Neves, A.A., *Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos*. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2006. **15**.
  42. Maniasso, N., *Ambientes micelares em química analítica*. Química Nova, 2001. **24**: p. 87-93.
  43. Nitschke, M. e Pastore, G.M., *Biossurfactantes: propriedades e aplicações*. Química Nova, 2002. **25**: p. 772-776.
  44. Silva, R.A., Wang, C.C., Fernández, L.P., Masi, A.N., *Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles*. Talanta, 2008. **76**(1): p. 166-171.
  45. Sabry, S.M., *Determination of flufenamic and mefenamic acids in pharmaceutical preparations using organized media*. Analytica Chimica Acta, 1998. **367**(1): p. 41-53.
  46. Wang, C.C., Silva, R.A., Masi, A.N., Fernandez, L., *Sensitive surfactant-mediated spectrofluorimetric determination of sildenafil*. Analytical Methods, 2010. **2**(5): p. 519-524.
  47. Guo, C., Wang, L., Hou, Z., Jiang, W., Sang, L., *Micelle-enhanced and terbium-sensitized spectrofluorimetric determination of gatifloxacin and its interaction mechanism*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009. **72**(4): p. 766-771.

48. Vílchez, J.L., Taoufiki, J., Ballesteros, O., Navalón, A., *Micelle-enhanced spectrofluorimetric method for the determination of antibacterial trovafloxacin in human urine and serum*. *Microchimica Acta*, 2005. **150**(3): p. 247-252.
49. Garcia Pinto, C., Perwez Pavon, J.L., Moreno Cordero, B., *Cloud point preconcentration and high performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with fluorescence detection*. *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(6): p. 874-881.
50. Tabrizi, A.B., *A cloud point extraction-spectrofluorimetric method for determination of thiamine in urine*. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*, 2006. **27**(10): p. 1604.
51. Vojić, M.P., Popović, G.V., Sladić, D.M., Pfenđt, L.B., *Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2005. **70**(1): p. 67-78.
52. Brasil, R.R.E., n<sup>o</sup> 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF*, 2003. **2**.
53. de Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2003: Editora da UNICAMP.
54. Teófilo, R.F. e Ferreira, M.M.C., *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial*. *Química Nova*, 2006. **29**(2): p. 338.