

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



Desenvolvimento de Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo para a Determinação de Peróxido de Hidrogênio e Cetoconazol

JURACIEMA DA SILVA BASTOS

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.

Professor Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

Dourados - MS
Fevereiro/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

| | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B324d | <p>Bastos, Juraciema da Silva. Desenvolvimento d sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio e cetoconazol. / Juraciema da Silva Bastos. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 68f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Análise por injeção e fluxo. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Cetoconazol.I. Título.</p> |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

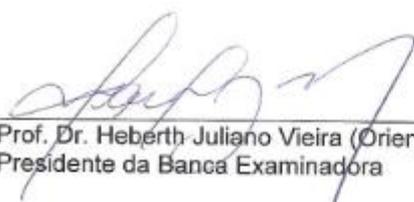
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



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

Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Desenvolvimento de Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo para a Determinação de Peróxido de Hidrogênio e Cetoconazol", de autoria de Juraciema da Silva Bastos, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.



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



Profa. Dra. Marcela Zanetti Corazza
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Luiz Carlos Soares de Figueiredo Filho
Membro Examinador (IFPR)

Dourados/MS, 26 de fevereiro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos **meus pais Carlos** Henrique de Lima Quedinho e Aparecida de Fátima da Silva, ao **meu esposo** Altiério Cústodio da Silva, à **minha filha** Iara Bastos Custódio da Silva e a **minha irmã** Iraciema da Silva Bastos, pessoas mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por iluminar o meu caminho.

Ao professor **Dr Heberth Juliano Vieira**, muito mais do que orientador, um grande amigo, que nesse processo de criação mostrou profissionalismo, rigor, equilíbrio, compreensão, atenção e um convívio agradável que só fez aumentar minha admiração por sua pessoa. Agradeço por acreditar em mim, pelos ensinamentos e pela confiança depositada para a realização deste trabalho.

À professora **Dr^a Daniele Mignolo dos Santos**, por estar presente na minha caminhada acompanhando de perto minha evolução. Meus sinceros agradecimentos por partilhar comigo um milionésimo da sua sabedoria, lhe admiro muito por ver que a senhora é um exemplo de profissional (professora) que sabe refletir sobre a sua prática como docente e sabe direcionar seu aluno segundo a realidade em que atua.

Ao programa de **Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados** pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao **LECA-UFGD**.

Ao **CNPq, a Capes e a Fundect** pela bolsa de mestrado concedida.

A minha tia **Maria do Carmo da Silva**, por ser a inspiradora na escolha do meu curso de graduação.

A minha sobrinha **Irys dos Santos da Silva Cerqueira**, por ser a grande companheira da minha filha nos momentos aos quais eu estava desenvolvendo o presente trabalho no laboratório.

Ao amigo de laboratório **Manoel Garcia de Oliveira**, por me ajudar efetivamente à desenvolver o trabalho e me animar nos momentos difíceis.

Ao amigo de laboratório **Herbert Lee B.V de Barros** pela ajuda (digo de passagem que não foi pouca) no decorrer do mestrado.

A todos os **Colegas da Pós-Graduação**, pela convivência, pelos momentos alegres e pelas dificuldades que compartilhamos.

A todos que contribuíram, de forma direta e indireta, para a realização deste trabalho, pois tenho certeza que sozinha não conseguiria concluí-lo. Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1.1 - Procedimentos para a determinação de cetoconazol..... | 18 |
| Tabela 1.2 - Procedimentos para a determinação de peróxido de hidr..... | 20 |
| Tabela 4.1 - Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de peróxido de hidrogênio..... | 37 |
| Tabela 4.2 - Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de peróxido de hidrogênio..... | 39 |
| Tabela 4.3 - Comparação entre procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 40 |
| Tabela 4.4 - Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em formulações comerciais empregando o procedimento em fluxo proposto..... | 41 |
| Tabela 4.5 - Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite (marca A)..... | 43 |
| Tabela 4.6 - Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite (marca B)..... | 44 |
| Tabela 4.7 - Parâmetros físicos estudados na otimização do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 51 |
| Tabela 4.8 - Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 51 |
| Tabela 4.9 - Comparação entre os parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 56 |
| Tabela 4.10 - Estudo de recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas comerciais empregando o procedimento proposto..... | 57 |
| Tabela 4.11 - Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e das curvas de adição de padrão..... | 60 |
| Tabela 4.12 - Determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto (FIA-r) e o procedimento comparativo (espectrofluorimétrico)..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Figura esquemática das unidades constituintes de um sistema em fluxo..... | 15 |
| Figura 2 – Estrutura química do cetoconazol..... | 17 |
| Figura 3.1 – Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio com detecção espectrofotométrica..... | 28 |
| Figura 3.2 – Sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação de cetoconazol utilizando nitrato de Ce(IV) e amônio como reagente e detecção espectrofotométrica..... | 31 |
| Figura 4.1 – Espectro de absorção molecular do metavanadato de amônio e do metavanadato de amônio oxidado em H ₂ SO ₄ 1,0 mol L ⁻¹ | 32 |
| Figura 4.2 – Efeito da concentração de metavanadato amônio (em ácido sulfúrico 1,0 mol.L ⁻¹) sobre o sinal analítico..... | 33 |
| Figura 4.3 – Efeito da concentração do carregador H ₂ SO ₄ sobre o sinal analítico na determinação de peróxido de hidrogênio..... | 34 |
| Figura 4.4 – Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de peróxido de hidrogênio sobre o sinal analítico. | 35 |
| Figura 4.5 – Efeito do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico..... | 36 |
| Figura 4.6 – Efeito da vazão do fluido carregador na bomba peristáltica na determinação de peróxido de hidrogênio sobre o sinal analítico..... | 37 |
| Figura 4.7 – Curva analítica para a determinação de peróxido de hidrogênio empregando o procedimento FIA proposto..... | 38 |
| Figura 4.8 – Diagrama obtido no estudo de repetibilidade para determinação de peróxido de hidrogênio empregando o procedimento FIA proposto. Concentrações de peróxido de hidrogênio 4,0×10 ⁻³ mol.L ⁻¹ e 1,96×10 ⁻³ mol.L ⁻¹ , respectivamente..... | 39 |
| Figura 4.9 – Curva analítica para a determinação de peróxido de hidrogênio empregando o procedimento em fluxo proposto..... | 43 |
| Figura 4.9.1 – Curva de adição de padrão para a determinação de peróxido de hidrogênio no leite (marca B). Absorbância (--■--). | 45 |
| Figura 4.10 – Espectro de absorção molecular do cetoconazol, do Ce(IV) e do produto de oxidação da reação química..... | 46 |
| Figura 4.11 – Efeito da concentração de Ce(IV) sobre o sinal analítico na determinação de cetoconazol empregando o procedimento FIA proposto..... | 47 |
| Figura 4.12 – Efeito da concentração do ácido sulfúrico utilizado como fluido carregador..... | 48 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.13 – Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 49 |
| Figura 4.14 – Efeito do volume da alça de amostragem na determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 50 |
| Figura 4.15 – Efeito da vazão do carregador sobre o sinal analítico na determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto..... | 50 |
| Figura 4.16 – Curva analítica do procedimento FIA proposto com detecção espectrofotométrica para a determinação de cetoconazol..... | 52 |
| Figura 4.17 – Fiagrama obtido no estudo de repetibilidade empregando o procedimento proposto na determinação de cetoconazol $1,00 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ utilizando Ce(IV) como reagente..... | 53 |
| Figura 4.18 – Fiagrama obtido no estudo de repetibilidade empregando o procedimento proposto na determinação de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ utilizando Ce(IV) como reagente..... | 54 |
| Figura 4.19 – Comparação do consumo de reagente Ce(IV) de diferentes procedimentos descritos e do procedimento FIA proposto..... | 55 |
| Figura 4.20 – Curva de adição de padrão para a determinação de cetoconazol (na amostra A) utilizando Ce(IV) como reagente..... | 58 |
| Figura 4.21 – Curva analítica com adição de padrão para a determinação de cetoconazol (na amostra B) utilizando Ce(IV) como reagente..... | 59 |
| Figura 4.22 – Espectro de emissão de uma solução padrão de cetoconazol $6,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em de ácido sulfúrico 0,010 mol.L ⁻¹ ($\lambda_{\text{ex}}=225$ nm; $\lambda_{\text{em}}=380$ nm)..... | 61 |
| Figura 4.23 – Espectro de emissão de cetoconazol para uma amostra do comprimido B em de ácido sulfúrico 0,01 mol.L ⁻¹ ($\lambda_{\text{ex}}=225$ nm; $\lambda_{\text{em}}=380$ nm)..... | 62 |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 Sistema de análise por injeção em fluxo..... | 14 |
| 1.2 Cetoconazol..... | 16 |
| 1.3 Procedimentos analíticos para determinação de cetoconazol..... | 18 |
| 1.4 Peróxido de hidrogênio..... | 19 |
| 1.5 Peróxido de Hidrogênio em amostras de leite bovino UHT..... | 21 |
| 2.OBJETIVO..... | 23 |
| 3.PARTE EXPERIMENTAL..... | 24 |
| 3.1 Instrumentação..... | 24 |
| 3.2 Sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 24 |
| 3.2.1 Reagentes e soluções..... | 24 |
| 3.2.1.2 Ensaio de recuperação do peróxido de hidrogênio em amostras de comerciais utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica..... | 25 |
| 3.2.1.3 Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais (água oxigenada 3%) por permanganometria..... | 27 |
| 3.2.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 27 |
| 3.3 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas com detecção espectrofotométrica..... | 28 |
| 3.3.1 Reagentes e soluções..... | 28 |
| 3.3.1.2 Ensaio de recuperação do cetoconazol adicionados em amostras de comprimidos empregando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol proposto..... | 29 |
| 3.3.1.3 Procedimento comparativo para a determinação do cetoconazol..... | 30 |
| 3.3.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas empregando Ce(IV) como reagente..... | 30 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 4.1 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 32 |
| 4.1.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 33 |
| 4.1.2 Estudos dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio..... | 35 |
| 4.1.3 Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais..... | 38 |
| 4.1.4 Estudo de recuperação de H ₂ O ₂ em amostras comercial de água oxigenada empregando sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica..... | 41 |
| 4.1.5 Determinação de peróxido de hidrogênio em amostra comercial de água oxigenada 3% empregando permanganometria..... | 42 |
| 4.1.6 Estudo de recuperação de H ₂ O ₂ em amostras de leite UHT empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica proposto..... | 42 |
| 4.2 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas empregando Ce (IV) como reagente..... | 45 |
| 4.2.1 Estudo dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 46 |
| 4.2.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol utilizando Ce (IV) como reagente..... | 48 |
| 4.2.3 Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente..... | 51 |
| 4.2.4 Estudo de recuperação de cetoconazol utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica e Ce (IV) como reagente..... | 56 |
| 4.2.5 Comparação entre a curva analítica para o sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação o cetoconazol e as curvas analíticas para adição de padrão das amostras (A e B)..... | 57 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.6 Análise comparativa para a determinação de cetoconazol em comprimidos..... | 60 |
| 5.CONCLUSÕES..... | 64 |
| 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E CETOCONAZOL. Neste trabalho de dissertação são apresentados o desenvolvimento de procedimentos de análises por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação peróxido de hidrogênio e cetoconazol. Para a determinação de peróxido de hidrogênio, utilizou-se amostras comerciais de água oxigenada e amostras de leite UHT, na qual o preparo de amostra foi a simples diluição. Para a determinação de cetoconazol, utilizou-se amostras farmacêuticas, comprimidos, na qual o preparo da amostra foi realizado de maneira simples. Um sistema em fluxo para a determinação peróxido de hidrogênio foi otimizado monitorando-se espectrofotometricamente a reação química entre o peróxido de hidrogênio e o metavanadato de amônio em meio ácido em 450 nm. A curva analítica apresentou uma linearidade entre $8,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e um limite de detecção de $2,4 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Desvios padrão relativos menores que 1,2% (n=10) para soluções de peróxido de hidrogênio com concentrações de $1,9 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e uma frequência analítica de 60 determinações h⁻¹ foram obtidos. Outro sistema de análise por injeção em fluxo foi proposto para a determinação de cetoconazol. Nesse procedimento, foi monitorado espectrofotometricamente em 500 nm o produto da reação química entre o cetoconazol e o reagente nitrato de Ce(IV) e amônio. A curva analítica apresentou uma linearidade entre $6,0 \times 10^{-5}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Desvios padrão relativos menores que 4,5% (n=10) para soluções de cetoconazol com concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e frequência de analítica de 60 determinações h⁻¹ foram obtidos.

PALAVRAS-CHAVES: validação, espectrofotometria, FIA, adição de padrão

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION ANALYSIS SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND KETOCONAZOLE. In this dissertation presents the development of two different flow injection procedures with spectrophotometric detection for the determination of hydrogen peroxide and ketoconazole. The determination of hydrogen peroxide was determined in commercial samples and UHT milk samples. For the determination of ketoconazole, we used samples pharmaceutical tablets. The flow system for determining hydrogen peroxide was optimized by monitoring spectrophotometrically the product of chemical reaction between the peroxide and ammonium metavanadate in an acid medium. The calibration curve showed linearity from 8.0×10^{-4} to 8.0×10^{-3} mol.L⁻¹ and a limit detection of 2.4×10^{-4} mol.L⁻¹ was obtained. Relative standard deviations lesser than 1.2% (n = 10) for hydrogen peroxide solutions with concentrations of 1.96×10^{-3} and 4.0×10^{-3} mol.L⁻¹ were obtained. The analytical frequency of 60 determinations per hour was obtained. Another flow system has been proposed for the determination of ketoconazole. In this system, chemical reaction between the reagent cerium(IV) and ammonia nitrate and ketoconazole was monitored spectrophotometrically at 500 nm. The linearity of calibration curve between 6.0×10^{-5} and 9.5×10^{-5} mol.L⁻¹ and the limit detection of 1.0×10^{-5} mol.L⁻¹ were obtained. The relative standard deviations lesser than 4.5% (n = 10) for ketoconazole solutions with concentrations of 1.0×10^{-4} to 1.9×10^{-4} mol.L⁻¹ and analytical frequency of 60 determination per hour were obtained.

KEYWORDS: validation, spectrophotometry, FIA, standard addition

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema de análise por injeção em fluxo

Natural da antiga Tchecoslováquia e na época, domiciliado na Dinamarca, o pesquisador Jaromir Ruzicka, propôs em 1975 o processo de análise química em fluxo¹. No Brasil, a análise por injeção em fluxo foi introduzida em 1976, no qual o próprio Ruzicka permaneceu por um ano em território brasileiro, como perito da Agência Internacional de Energia Atômica assessorando a instalação do laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP).²

A atual necessidade de obtenção de dados de análises químicas de forma rápida e precisa é de extrema importância devido à solicitação social exigida pela nossa sociedade. Dentro deste contexto, a análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês Flow Injection Analysis) é uma técnica analítica que atende as atuais necessidades, destacando-se ainda, o grande aumento do desempenho analítico e a capacidade do uso efetivo da instrumentação analítica com racional gerenciamento dos reagentes químicos (tendo em vista que os métodos analíticos estão voltados ao monitoramento ambiental).^{3,4}

Muitos procedimentos analíticos considerados padrões de referência não são ecologicamente corretos, com base nesta afirmação, tanto a toxicidade dos produtos químicos utilizados quanto a toxicidade dos produtos das reações químicas, devem ser analisados previamente ao se desenvolver um procedimento analítico, pois não é uma tarefa fácil substituir os reagentes a serem utilizados em um procedimento analítico sem alterar o seu desempenho.⁴

Os sistemas em fluxo diferem dos métodos por batelada, devido ao fato de não haver necessidade de atingir o equilíbrio químico, pois uma característica desses sistemas, além da injeção da amostra e dispersão controlada da zona de amostra, é o intervalo de tempo entre a introdução da amostra e a detecção ser altamente repetível.³

Neste escopo, a análise por injeção em fluxo refere-se a um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução é introduzida em fluido transportador que a conduz em direção ao detector. Quando a conversão da amostra a uma espécie detectável é indispensável, a amostra pode receber uma série de reagentes ou tratamentos para a sua conversão.³

Os sistemas em fluxos são constituídos por uma unidade propulsora de fluidos, de inserção de amostras (injetor), de reação/mistura e de detecção.³

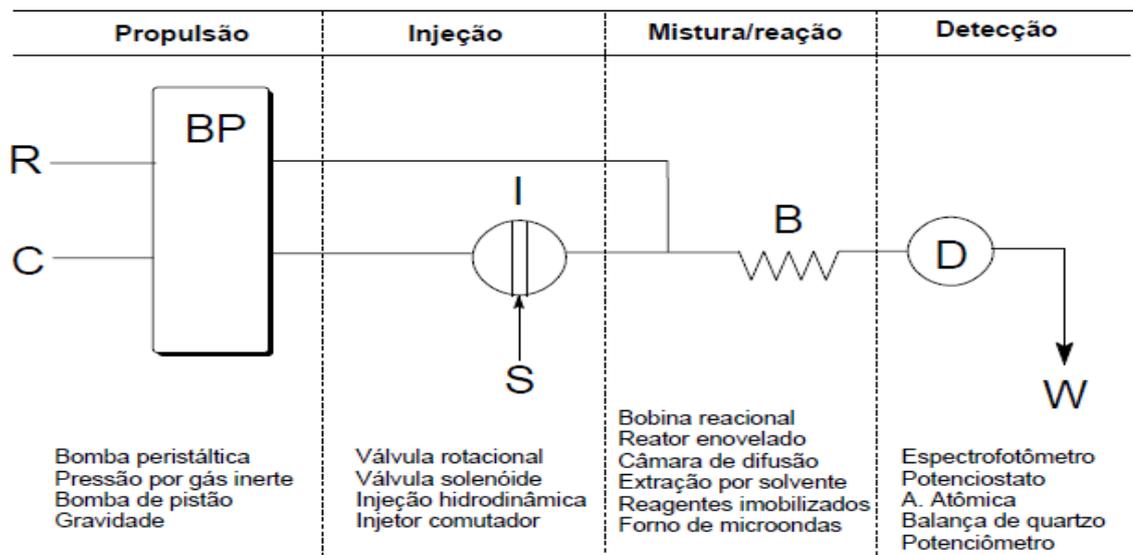


Figura 1- figura esquemática das unidades constituintes de um sistema em fluxo: R: reagente; C: carregador; I: Injetor; S: solução de referência ou amostra; B: Bobina reacional; D: detector e W: descarte.³

O sistema de propulsão mais utilizado é a bomba peristáltica, na qual pode ser operacionalizada com vazões de $0,1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.³

A unidade de injeção (injetor) em um sistema em fluxo é o constituinte de maior importância, pois o volume de solução injetado gera um gradiente de concentração, que por sua vez fornece a informação analítica do sistema⁵. O volume de amostra a ser injetado em um sistema em fluxo é um dos parâmetros essenciais, pois o mesmo não deve causar distúrbios no fluxo, logo, o volume de amostra deve ser injetado de maneira reprodutível.³

É no percurso analítico que ocorrem as reações ou misturas necessárias para o processo de detecção. No tocante a detecção, diversos detectores podem ser acoplados a um sistema em fluxo, evidenciando por sua vez a versatilidade da técnica.³

A análise por injeção em fluxo (FIA) possibilita desenvolver procedimentos analíticos com boa precisão utilizando equipamentos de baixo custo, além de possibilitar ao pesquisador que o mesmo crie seu módulo de análise. Podemos citar outros pontos vantajosos da técnica FIA, como por exemplo: por ser um sistema fechado, logicamente os riscos com contaminação diminuem; é uma técnica ecologicamente correta, visto que a sua utilização requer baixo consumo de reagentes (quando comparada aos métodos por batelada); diante de algumas vantagens da técnica FIA, fica evidente o potencial analítico da mesma.⁶

Os sistemas de análise por injeção em fluxo podem ser classificados como fluxo normal (FIA-n) e em fluxo reverso (FIA-r). Em um sistema FIA-n, um volume de amostra é injetada em um fluxo de solução carregadora. ⁴

O sistema de análise por injeção em fluxo reverso foi proposto inicialmente por JOHNSON e PETTY (1982). Neste sistema, ocorre à inversão entre a solução de reagente e solução de referência/amostras. Originalmente o sistema FIA-r foi elaborado para determinação de fosfato empregando o método de azul de molibdênio em águas marinhas aspiradas continuamente por um analisador oceanográfico. ³

Sistemas FIA-r têm como principais vantagens sobre outras configurações o aumento da sensibilidade e a economia de reagentes, isso se deve principalmente ao fato de quando se emprega a amostra como carregador, a concentração da amostra na zona de reagente dispersa aumenta com o aumento da dispersão. O contrário ocorre em sistemas em fluxo contínuo, pois o aumento da dispersão da zona de amostra resulta numa diminuição da concentração do analito em questão. ³

O volume de amostra disponível para a utilização de um sistema FIA-r é um fator crítico (deve ser previamente analisado) para seu emprego, porém, sistemas em fluxo reverso possibilitam minimizar diluições de amostras bem como possibilita o aumento da sensibilidade do procedimento analítico. ³

1.2 Cetoconazol

A entrada dos derivados imidazólicos na terapêutica (data na década de 70) representou grande avanço no tratamento das micoses, estes derivados imidazólicos foram os primeiros compostos a exercerem atividade contra o controle de leveduras; fungos que causam infecções em animais e humanos e fungos dimórficos. A partir da introdução dos derivados imidazólicos na terapêutica, vários compostos foram desenvolvidos por diversos laboratórios, sendo utilizados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas (causadas por fungos invasivos), visto que possui atividade fungistática e fungicida. ⁷

A partir de 1981, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso do cetoconazol. O fármaco possui ação sistêmica e local, pode ser introduzido em diversas formulações. ⁷

O mecanismo de ação do cetoconazol envolve a inibição da biossíntese do ergosterol ou outros esteróis, danificando as membranas celulares do fungo, alterando também sua permeabilidade, fazendo com que o fungo passe a perder cátions, proteínas e outros elementos

vitais, ocorrendo por fim, o rompimento da membrana tendo como resultado a perda de seus elementos intracelulares.⁸

Quanto a solubilidade, o cetoconazol é solúvel em água somente em pH abaixo de três, não sendo, portanto, disponível em forma parenteral, sua absorção ocorre no trato gastrointestinal. A administração sistêmica é relativamente segura, podendo, porém, surgir alguns efeitos colaterais como anorexia, náuseas e vômitos. A maioria dos efeitos colaterais acontecem após o uso de concentrações acima de 800mg/dia, tendo em vista que a dose diária para um adulto e de no máximo 400 mg.⁹

O cetoconazol, (*cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1ilmetil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, possui fórmula molecular $C_{26}H_{28}Cl_2O_4N_4$ e sua estrutura química está apresentada na Figura 2. Este fármaco está sujeito a sofrer modificações por processos de degradação tais como oxidação e hidrólise.¹⁰

O processo de oxidação do cetoconazol em meio aquoso ácido promove mudança de coloração do fármaco de branco para róseo, reação que pode ocorrer em preparações farmacêuticas de uso tópico como comprimidos, cremes e xampus que não apresentem características físico-químicas adequadas.¹⁰

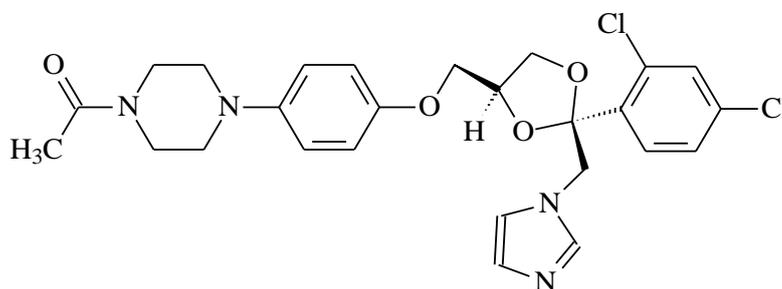


Figura 2 - Estrutura química do cetoconazol.

1.3 Procedimentos analíticos para determinação de cetoconazol.

A literatura dispõe diversos métodos para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas, os quais podem ser observados na Tabela 1.1. Entre estes, destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta, métodos voltamétricos e espectroscópicos.

Tabela 1.1- Procedimentos para a determinação de cetoconazol.

| Método | Linearidade (mol.L ⁻¹) | Límite de detecção (µg.L ⁻¹) | Amostra | Ref. |
|---------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|------|
| VOQ | $4,97 \times 10^{-7} - 4,30 \times 10^{-6}$ | 61,1 | Comprimido, creme e shampoo | [11] |
| UV-Vis | $3,01 \times 10^{-6} - 3,01 \times 10^{-5}$ | 0,17 | Comprimido, creme e shampoo | [12] |
| CLAE-UV | $1,13 \times 10^{-4} - 9,03 \times 10^{-4}$ | Não fornecido | Shampoo | [7] |
| VPD | $3,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ | Não fornecido | Comprimido e creme | [13] |

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada; CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta; VPD – Voltametria de Pulso; UV-Vis – Espectrofotometria UV-Vis.

VOJIC *et al.*¹⁴ propuseram um método espectrofotométrico (utilizando comprimento de onda 225 nm), para quantificação direta de cetoconazol em comprimidos comerciais utilizando extração com água, obtendo uma faixa linear de trabalho de $5,65 \times 10^{-3}$ a $5,65 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹.

SADEGHI & SHAMSIPUR¹⁵ desenvolveram um procedimento baseado na formação de uma espécie colorida proveniente da reação química entre o cetoconazol e o ácido pícrico, cujo, a reação ocorre em pH 2,5 em meio de clorofórmio, o detector é um espectrofotômetro programado para obtenção da absorção num comprimento de onda de 410 nm. Neste procedimento a faixa linear de trabalho foi de $1,88 \times 10^{-3}$ a 0,11 mol.L⁻¹.

RANE & PADMAJA¹⁶ desenvolveram um procedimento espectrofotométrico para a determinação de cetoconazol em comprimidos baseado na amplificação de reações, neste método a faixa linear de trabalho foi de $4,02 \times 10^{-10}$ a $3,21 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹.

SCATOLIN & TUBINO¹⁷ propuseram um método de análise por injeção em fluxo para a determinação de cetoconazol em comprimidos, baseando-se na reação química entre o cetoconazol e o íon Fe (III) em meio ácido, a reação química foi monitorada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de máxima absorção equivalente a 495

nm. A faixa linear de trabalho foi de $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O limite de detecção e o limite de quantificação foram estimados em $1,0 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Tendo em vista a necessidade de procedimentos analíticos que sejam rápidos, sensíveis e de baixo custo, procedimentos de análise por injeção em fluxo mostram-se como uma ferramenta promissora para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas, pois a mesma preenche os pré-requisitos exigidos e atende ao princípio da química verde.

1.4 Peróxido de Hidrogênio

O início da comercialização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) data de 1800, e sua produção mundial aumenta anualmente. Acredita-se que o peróxido de hidrogênio, na forma isolada ou combinada (principalmente) seja um dos reagentes mais utilizados nas mais diversas aplicações, como por exemplo, nos processos de branqueamento nas indústrias têxtil, de celulose e de papel, na indústria de alimentos e na indústria de medicamentos.¹⁸

O H₂O₂ é uma substância oxidante, que pode ser convertida em radicais hidroxilas por catálise; em muitos organismos, o peróxido de hidrogênio é um metabólito natural o qual resulta em água e oxigênio molecular, quando decomposto. Na medicina, a determinação de peróxido de hidrogênio tem notável importância, pois sua presença deve ser monitorada para se evitar que as células sofram estresse oxidativo.¹⁸

A determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais de água oxigenada emprega o método clássico de volumetria por oxi-redução (permanganometria), na qual se baseia na relação estequiométrica entre o peróxido de hidrogênio e o íon permanganato, possibilitando por sua vez quantificar o peróxido de hidrogênio contido na amostra comercial.

Várias técnicas são capazes de determinar o peróxido de hidrogênio, como por exemplo, a espectrofotometria, a volumetria, a quimiluminescência, a fluorimetria, a cromatografia e métodos eletroquímicos.¹⁸

A Tabela 1.2 mostra alguns métodos para a determinação de peróxido de hidrogênio.

Tabela 1.2 – Procedimentos para a determinação de peróxido de hidrogênio.

| Técnica | Considerações da detecção | Intervalo linear ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) | Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) | Aplicação | Ref |
|----------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------|------------|
| Q | Luminol e Co(II) | 3,5 – 71 | Não informado | Ambiental | [19] |
| UV-Vis | Fenol e peroxidase | 2 – 10 | 0,5 | Ambiental | [20] |
| F | Ácido p-hidroxifenilpropionico e peroxidase | Não informado | Não informado | Ambiental | [21] |
| EL | Luminol em meio alcalino (sistema K_2CO_3) | 10 – 0,005 | 4300 | Caracterização | [22] |

Q - quimiluminescência, UV-vis – espectrofotometria UV-Vis, F – fluorescência, EL – eletroluminescência.

A espectrofotometria UV-vis é uma das técnicas analíticas mais utilizadas nos laboratórios, pois, trata-se de uma técnica de análise que, se comparada a outras técnicas, possui baixo custo; é de fácil operacionalidade, atinge sensibilidade, etc. No tocante a determinação de peróxido de hidrogênio, a técnica de espectrofotometria UV-Vis tem sido muito citada.²³

A seguir, podemos citar algumas metodologias para a determinação de peróxido de hidrogênio.

OLIVEIRA *et al.*²³ apresentaram uma proposta para monitorar o peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação do ácido dicloroacético. A proposta se baseia na reação química entre o peróxido de hidrogênio e o vanadato, em meio reacional ácido, utilizando o comprimento de onda de 446 nm.

HUANG *et al.*²⁴ determinaram peróxido de hidrogênio através da espectrofotometria empregando várias enzimas e reagentes, tais como 4-aminoantipiridina e N,N-dietilanilina, porfirina entre outras, e obtiveram faixa linear de trabalho até $8,6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

DA SILVA *et al.*²⁵, desenvolveram um procedimento amperométrico simples por injeção em fluxo utilizando um sensor integrado de três eletrodos para a determinação de H_2O_2 em anti-séptico bucal. O método desenvolvido envolve a utilização de um eletrodo de trabalho modificado com compósitos de partículas de azul de prússia que foi

facilmente adaptados como detector na FIA . O procedimento proposto apresentou uma resposta linear na faixa de 10 a 200 mmol.L⁻¹ . Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,8 e 2,6 mmol.L⁻¹, respectivamente.

Como pode ser observado anteriormente, os procedimentos analíticos para a determinação de peróxido de hidrogênio empregam diversos reagentes orgânicos e geram resíduos com potencialidades tóxicas ao meio ambiente; visando menor consumo reagentes e menor geração de resíduos, a técnica de análise por injeção em fluxo, mostra-se como uma potente ferramenta para este fim, além do seu baixo custo de implementação e alta frequência analítica.

1.5 Peróxido de Hidrogênio em amostras de leite bovino UHT

O leite é uma mistura homogênea de grande quantidade de substâncias e nutrientes, no qual muitas destas substâncias e nutrientes encontra-se em emulsão (lipídeos e substâncias associadas), algumas em suspensão (caseínas ligadas a sais) e outras em dissolução (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc)²⁶. Sua composição de 87% m/v em água.²⁷

A lactose é o principal carboidrato encontrado no leite e o que menos sofre variação (4,7% a 5,2 % no leite de vaca). Ela pertence ao grupo dos dissacarídeos sendo composta por glicose e galactose. A lactose causa problema para a fabricação de subprodutos como sorvete, leite condensado e doce de leite, pois é um dos açúcares comum mais insolúvel. A lactose possui importância biológica, pois ajuda na absorção de cálcio no organismo. Esta absorção se deve à redução do pH intestinal, que leva à solubilidade e disponibilidade dos compostos do cálcio.²⁸

Os triglicerídeos são os componentes majoritários dos lipídeos (95%) encontrados no leite, os outros 5% constituem-se de ácidos graxos como o butírico, capríco, caprílico, láurico, mirístico, esteárico e oléico.^{27,28} Segundo Embrapa, a concentração de gordura no leite pode variar de 3,5% a 5,3%, esta variação se deve a vários fatores, como raça (do gado leiteiro), alimentação, o manejo do gado e o estágio de lactação.²⁹

As principais proteínas encontradas no leite são as caseínas (80%) e as proteínas do soro (20%). Os sais minerais constituem-se de fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonato de sódio.^{26, 27} O leite contém também diversas vitaminas, classificadas como lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (complexo B e C). Estas são susceptíveis à

destruição por diversos fatores como tratamento térmico, ação da luz, oxidação com O₂ ou outros contaminantes.³⁰

Devido à composição físico-química e microbiológica, o leite é um alimento altamente perecível e por isso deve ser submetido, logo após sua obtenção, a um processo com a finalidade de evitar a multiplicação de microrganismos presentes. A escolha do tratamento (térmico) vai depender do produto que se deseja obter (leite pasteurizado ou UHT) e este tratamento térmico está diretamente relacionado ao prazo de validade do produto, o leite UHT possui em média um prazo de validade de 180 dias em embalagem fechada, após abertura, recomenda-se que o produto seja armazenado na geladeira e consumido num prazo de 3 dias para evitar possíveis contaminações.²⁸

Como mencionado anteriormente, o leite é altamente perecível e muitos laticínios adulteram o leite adicionando peróxido de hidrogênio (água oxigenada) para aumentar a vida útil do produto, uma vez que atua sobre o desenvolvimento dos microrganismos contaminantes do leite, impedindo assim o aumento da acidez. É sabido que em alguns países da Europa essa prática é adotada para preservar, e não alterar, a qualidade do leite cru, pois se sabe também que a água oxigenada adicionada será decomposta em água mais oxigênio quando o leite for submetido ao tratamento térmico, dessa forma, seria impossível detectar a presença dessa substância no leite UHT.³¹

No Brasil, esta adulteração é proibida pela ANVISA. O peróxido também pode ser encontrado em leite devido à lavagem ineficiente dos instrumentos (esterilizados com H₂O₂) nas cooperativas de leite, logo, o desenvolvimento de metodologias rápidas e confiáveis para a quantificação de H₂O₂ em leite se faz necessário, pois identificaria uma possível fraude na própria cooperativa de leite, dentro deste escopo, os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) são apazíveis, devido a alta frequência analítica, baixo consumo de amostra e reagente, baixo custo e alta reprodutibilidade.³²

2. OBJETIVOS

Desenvolver um procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinar peróxido de hidrogênio (em amostras comerciais e amostras de leite) e cetoconazol em formulações comerciais e farmacêuticas.

2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver procedimento analítico para determinação de peróxido de hidrogênio empregando íon metavanadato como reagente e Sistema de análise por injeção em Fluxo reverso.
- Desenvolver procedimento analítico para determinação de cetoconazol empregando Ce(IV) como reagente e sistema de análise por injeção em fluxo com confluência.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se balança analítica Bel Engineering modelo M214Ai com precisão de $\pm 0,1$ mg. Utilizou-se banho ultrassônico (Cristófilo, São Paulo-SP) para dissolução dos reagentes. As medidas espectrofométricas foram realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-Vis Cary, modelo 50 CONC (Varian[®]) com cubeta de quartzo de 3,5 mL (caminho óptico 10,0 mm), célula de fluxo de quartzo Hellma (caminho óptico 10,0 mm).

Para a propulsão das soluções de reagentes e referência/amostras utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec[®] (Zurique, Suíça) com oito canais, modelo IPC-8. Empregou-se tubos e conexões de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno para a confecção das alças de amostragem, bobinas reacionais e linhas de condução das soluções de referência e amostras. Utilizou-se tubos de propulsão de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos. As soluções de referência e as amostras foram introduzidas no sistema de injeção em fluxo utilizando-se um injetor comutador construído em acrílico (REIS & BERGAMIM-FILHO, 1993).³³

As espectrofluorimétricas foram realizadas em um Espectrofluorímetro (Varian[®] Cary Eclipse) equipado com lâmpada de Xenônio, utilizou-se cubeta de quartzo, com quatro faces polidas (caminho óptico de 10,0 mm) e volume de 3,5 mL.

3.2 Sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio.

3.2.1 Reagentes e soluções

A partir da solução estoque de peróxido de hidrogênio 30% (Vetec), $d = 1,11$ mg.mL⁻¹, preparou-se uma solução intermediária de peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹.

Para a otimização do sistema por injeção em fluxo utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, preparada a partir da solução estoque de peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹.

As soluções de trabalho de peróxido de hidrogênio ($7,40 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, $8,55 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, $1,86 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $2,82 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $3,79 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $5,68 \times 10^{-3}$

mol.L⁻¹, $6,60 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $7,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) para a obtenção da curva analítica foram preparadas diluindo-se os respectivos volumes de solução estoque de peróxido de hidrogênio ($9,29 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹). Quanto ao preparo das referidas diluições de solução de peróxido de hidrogênio, vale ressaltar que todas as soluções foram preparadas diariamente.

A solução de ácido sulfúrico 1,00 mol.L⁻¹ foi preparada a partir da solução estoque de ácido sulfúrico concentrado (Vetec[®], 99%, densidade = 1,84 mg.mL⁻¹).

A solução estoque de metavanadato de amônio 0,10 mol.L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 1,170 g deste reagente (Vetec, 99%) da seguinte maneira: adicionou-se 10,0 mL de ácido sulfúrico 0,100 mol.L⁻¹, 4,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (Vetec, 99% densidade = 1,84 mg.mL⁻¹) e levou-se ao banho ultrassônico por cerca de 7 minutos. Após o tempo transcorrido, transferiu-se o solubilizado para balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se com água destilada.

A solução de trabalho de metavanadato de amônio $5,00 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ foi preparada diluindo-se 25,0 mL da solução estoque de metavanadato de amônio (0,100 mol.L⁻¹) em meio de solução de ácido sulfúrico 1,0 mol.L⁻¹.

3.2.1.2 Ensaio de recuperação do peróxido de hidrogênio em amostras de comerciais de água oxigenada e amostras de leite utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica.

Amostra comercial de peróxido de hidrogênio

Para o preparo das amostras contendo peróxido de hidrogênio, pipetou-se 100 µL da amostra comercial (água oxigenada 10 volumes, 3%, Rioquímica (100 mL)) em balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se com água destilada.

Para as adições de padrão, adicionou-se a 100,0 µL da amostra diluída em balão volumétrico de 5,0 mL uma concentração $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de solução estoque de peróxido de hidrogênio e completou-se com água destilada. Fez-se a leitura da absorbância da primeira adição de padrão em triplicata.

Para as demais adições de padrão, adicionou-se a 100,0 µL da amostra diluída em balão volumétrico de 5,0 mL uma concentração $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de solução estoque de peróxido de hidrogênio, uma concentração de $7,40 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e completou-se com água destilada. Fez-se a leitura da absorbância da segunda adição de padrão em triplicata. O procedimento descrito anteriormente foi o mesmo para as demais adições de padrão, cujo

foram adicionadas concentrações de $8,55 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $1,86 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $2,82 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $5,68 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, e $7,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ preparadas por diluição da solução estoque de peróxido de hidrogênio. Fez-se a leitura da absorbância das adições de padrão em triplicata.

Amostra de Leite

Utilizou-se amostras de leite (leite UHT, integral, contendo 1,0 L e 3% de gordura) da marca Líder[®] (Fabricação: 28/02/16, Vencimento: 30/03/16, PP: 03:05, CS2) e da marca Elegê[®] (Fabricação: 02/03/16, Vencimento: 30/06/16, TT06/EA/19:58), ambas adquiridas no comércio local da cidade de Dourados-MS.

Para o preparo das amostras de leite (ambas as marcas mencionadas), pipetou-se 1000 μL da amostra (contida na caixinha de 1,0 L) em balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se com água destilada; em seguida, pipetou-se 100 μL (da primeira diluição da amostra de leite) em balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se com água destilada.

Pipetou-se 100 μL da amostra diluída de leite (obtida pela segunda diluição da amostra original de leite) em balão volumétrico de 5,0 mL, completou-se com água destilada. Fez-se a leitura da absorbância da amostra diluída em triplicata.

Para as adições de padrão, adicionou-se a 100,0 μL da amostra diluída de leite (obtida pela segunda diluição da amostra original de leite) em balão volumétrico de 5,0 mL uma concentração $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de solução estoque de peróxido de hidrogênio e completou-se com água destilada. Fez-se a leitura da absorbância da primeira adição de padrão em triplicata.

Para as demais adições de padrão, adicionou-se a 100 μL da amostra diluída de leite (obtida pela segunda diluição da amostra original de leite) em balão volumétrico de 5,0 mL uma concentração $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de solução estoque de peróxido de hidrogênio, acrescentou-se uma concentração de $2,82 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e completou-se com água destilada. Fez-se a leitura da absorbância da segunda adição de padrão em triplicata. O procedimento descrito anteriormente foi o mesmo para as demais adições de padrão, cujo foram adicionadas (ao balão volumétrico de 5,0 mL contendo 100,0 μL da amostra diluída de leite e $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de solução estoque de peróxido de hidrogênio) concentrações de $5,68 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $7,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ preparadas por diluição da solução estoque de peróxido de hidrogênio. Fez-se a leitura da absorbância das adições de padrão em triplicata.

3.2.1.3 Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais (água oxigenada 3%) por permanganometria.

Pipetou-se 2,0 mL de água oxigenada comercial (água oxigenada 10 volumes, 3%, Rioquímica® (100 mL)) e transferiu-se para um erlenmeyer de 250,0 mL de capacidade. Adicionou-se 50,0 mL de água destilada e 10,0 mL de solução de H₂SO₄ (1:5). Titulou-se lentamente com solução de KMnO₄ 0,0895 mol.L⁻¹ (solução previamente padronizada) até que a solução adquirisse coloração rósea permanente por aproximadamente 30 segundos. Fez-se o procedimento em triplicata. Calculou-se a % de peróxido de hidrogênio na amostra.

3.2.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio.

A Figura 3.1 apresenta o diagrama esquemático proposto do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio em formulações comerciais. Neste sistema, quando o injetor é comutado para a posição de análise, um volume de 300 µL de solução de referência ou amostra contendo peróxido de hidrogênio é inserido em um fluxo carregador e é transportado até o ponto de confluência na qual recebe um fluxo de NH₄VO₃ 5,00×10⁻³ mol.L⁻¹. A reação química é monitorada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 500 nm.

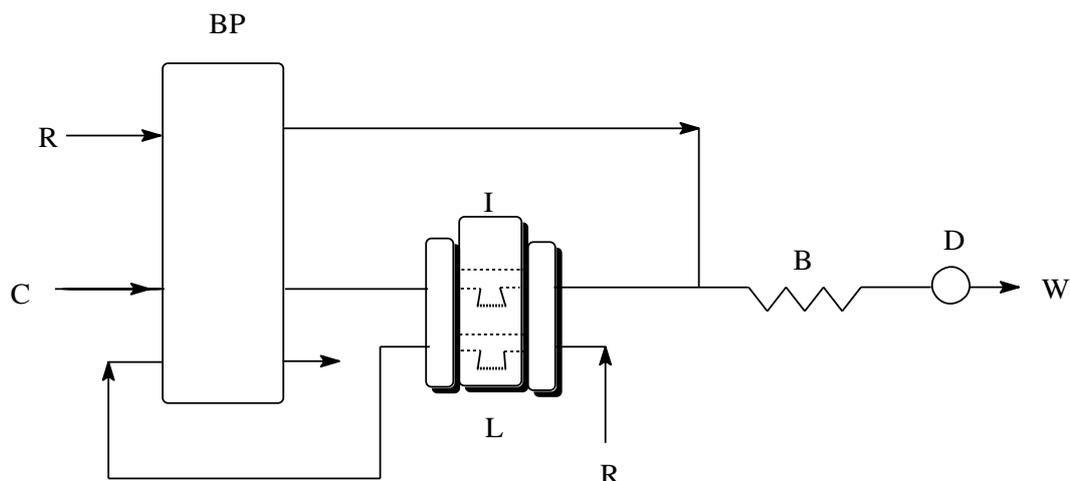


Figura 3.1 - Sistema de análise por injeção em fluxo com determinação espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio. R: solução de metavanadato de amônio $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ($2,1 \text{ mL.min}^{-1}$); C: solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ($2,5 \text{ mL.min}^{-1}$); BP: bomba peristáltica ($1,5 \text{ mL.min}^{-1}$); I: injetor comutador em acrílico; L: alça de amostragem ($300 \mu\text{L}$); R: solução de peróxido de hidrogênio; B: bobina reacional (40 cm); D: espectrofotômetro ($\lambda=500 \text{ nm}$); W: descarte.

3.3 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas empregando Ce(IV) como reagente.

3.3.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de cetoconazol $1,90 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 25,0 mg de cetoconazol (Galena, Campinas-SP, lote KET/M-10610, 99% pureza) em ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

A solução de trabalho de cetoconazol $7,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ utilizada para a otimização do sistema FIA foi preparada a partir da solução estoque de cetoconazol $1,90 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Estudou-se a concentração da solução de ácido sulfúrico como fluido carregador, preparou-se seis soluções de concentração fixa de cetoconazol ($7,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em balão volumétrico de 50,0 mL e avolumou-se com diferentes concentrações de ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$).

As soluções de trabalho de cetoconazol ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $7,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $9,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) empregadas para a obtenção da curva analítica foram preparadas diluindo-se os respectivos

volumes de solução estoque de cetoconazol ($7,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio de solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

A solução de ácido sulfúrico (Vetec[®], 99%, densidade = $1,84 \text{ mg.mL}^{-1}$) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada pipetando-se 53,8 mL em balão volumétrico de 1,0 L, completou-se com água destilada.

A solução estoque de nitrato de cério(IV) $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 25,0 mg deste reagente em meio de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

A solução de trabalho de nitrato de cério(IV) $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada por diluição da solução estoque de nitrato de cério(IV) $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.3.1.2 Ensaio de recuperação do cetoconazol em amostras de comprimidos utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol utilizando Ce (IV) como reagente.

Pesou-se 4 comprimidos de cetoconazol (amostra A) cujo rótulo descreve conter 200 mg de cetoconazol por comprimido, macerou-se os mesmos em almofariz e pistilo, pesou-se novamente a massa da amostra A e guardou-se em vidro âmbar.

Pesou-se precisamente a massa correspondente a um comprimido (amostra A), adicionou-se 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, levou-se ao banho ultrassônico por cerca de 8 minutos, filtrou-se (utilizando papel filtro) em balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou-se $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de solução estoque de cetoconazol e completou-se com solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

Pipetou-se 400 μL da amostra A em balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se com solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

Para as adições de padrão, adicionou-se aos 400 μL da amostra A em balão volumétrico de 50,0 mL, os respectivos volumes de solução estoque de cetoconazol foram adicionadas para se obter as concentrações $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $7,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $9,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e completou-se com solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

O procedimento experimental para a amostra B foi o mesmo descrito acima para a amostra A.

3.3.1.3 Procedimento comparativo para a determinação do cetoconazol.

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de excitação e emissão do cetoconazol, efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o comprimento de onda de excitação em 250 nm e monitorou-se a emissão entre 200 e 800 nm.

As fendas de emissão e de excitação, bem como os filtros foram estabelecidos de modo a fornecer o maior sinal analítico. As fendas de excitação e de emissão foram de 5 nm e a tensão do tubo fotomultiplicador foi de 600 V.

Os espectros de emissão foram obtidos para uma solução de cetoconazol $6,00 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,010 mol.L⁻¹ e para uma amostra de comprimido (cujo o preparo encontra-se no tópico 3.3.1.2, utilizou-se uma amostra do comprimido B em ácido sulfúrico 0,010 mol.L⁻¹). Obteve-se dos espectros de emissão em triplicata da solução padrão de cetoconazol $6,00 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,010 mol.L⁻¹ e para a referida a amostra de comprimido.

3.3.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas empregando Ce(IV) como reagente.

A Figura 3.2 apresenta a configuração do sistema em fluxo reverso empregado para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas com detecção espectrofotométrica. Neste sistema, a solução de amostra é propulsãoada pela bomba peristáltica. Quando o injetor é comutado para a posição de análise, um volume de 125 µL de solução nitrato de cério(IV) e amônio é inserido em um fluxo transportador que contém o H₂O₂. O produto da reação foi monitorada espectrofotometricamente em 500 nm.

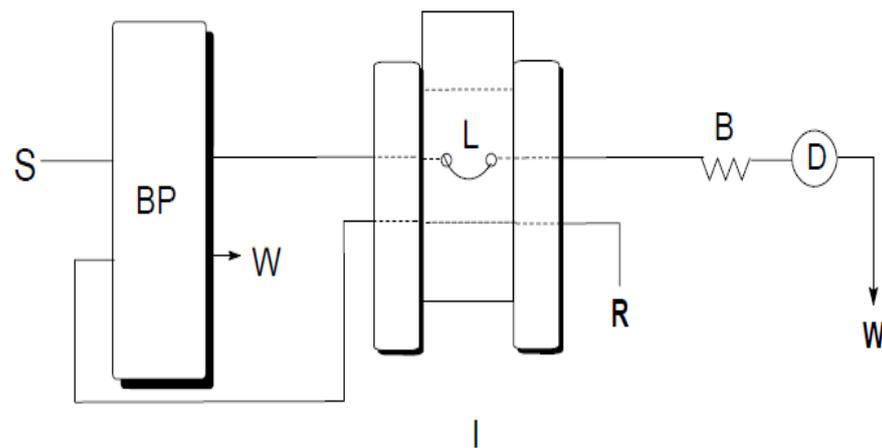


Figura 3.2 - Sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação espectrofotométrica de cetoconazol utilizando nitrato de Cério(IV) e amônio como reagente. S: solução de amostra ou solução de referência de cetoconazol em H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,90 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); BP: bomba peristáltica; L: alça de amostragem ($125 \text{ }\mu\text{L}$); R: solução de nitrato de cério(IV) amônio $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; B: bobina reacional (25 cm); D: espectrofotômetro ($\lambda = 500 \text{ nm}$); W: descarte; I: injetor comutador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio.

O procedimento proposto emprega a reação química entre o metavanadato de amônio e o peróxido de hidrogênio em meio ácido, levando a formação de um produto de reação com uma coloração avermelhada.³⁴



O espectro de absorção molecular do metavanadato de amônio e de seu produto de oxidação encontra-se na Figura 4.1. A substância oxidada apresenta uma absorção máxima em torno de 450 nm.

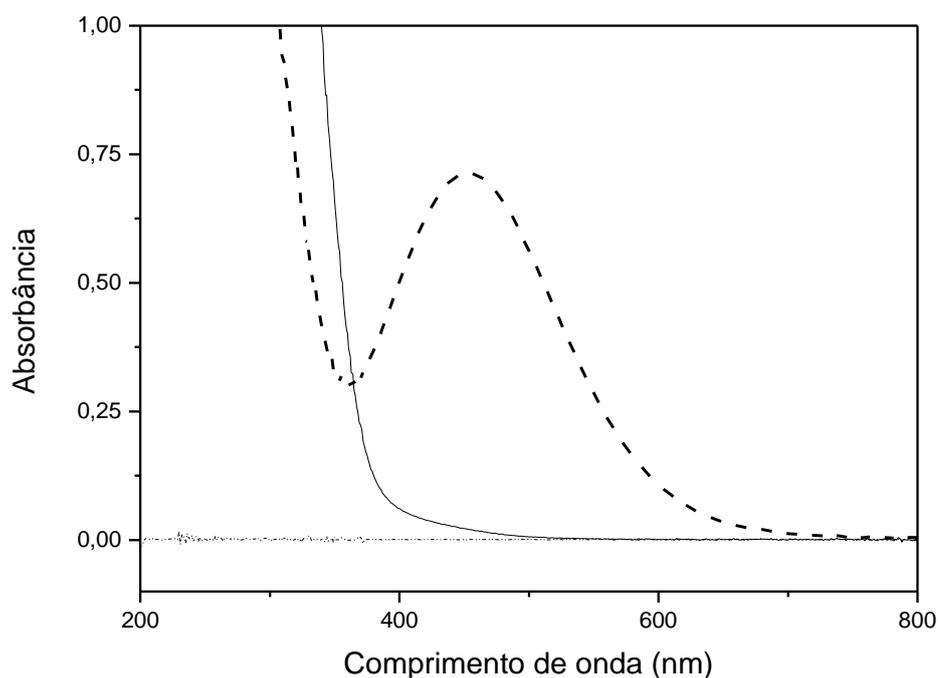


Figura 4.1 Espectro de absorção molecular do metavanadato de amônio (—) e do metavanadato de amônio oxidado em H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (- -).

4.1.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio.

Os parâmetros químicos foram otimizados univariavelmente, buscando melhor relação entre altura do sinal analítico e repetibilidade, bem como maior frequência analítica. A configuração do sistema de análise por injeção em fluxo empregado na otimização é ilustrado na Figura 3.1, com alça de amostragem de 300,0 μL , comprimento da bobina reacional de 40 cm, 20 cm de distância entre o injetor e a confluência. As vazões empregadas para a solução de H_2SO_4 1,0 mol.L^{-1} e solução de metavanadato de amônio foram respectivamente 2,5 mL.min^{-1} e 2,1 mL.min^{-1} .

Inicialmente foi avaliado o efeito da variação da concentração da solução de metavanadato de amônio sobre o sinal analítico (Figura 4.2). Variou-se a concentração de metavanadato de amônio (em ácido sulfúrico 1,0 mol.L^{-1}) e fixaram-se os demais parâmetros. As concentrações avaliadas de metavanadato de amônio foram $5,00 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} , $1,00 \times 10^{-2}$ mol.L^{-1} e $0,10$ mol.L^{-1} . A concentração da solução de metavanadato de amônio selecionada para os experimentos foi $5,00 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} , considerando-se que foi obtido menor consumo de reagente e melhor resposta analítica e menor desvio padrão relativo para esta concentração.

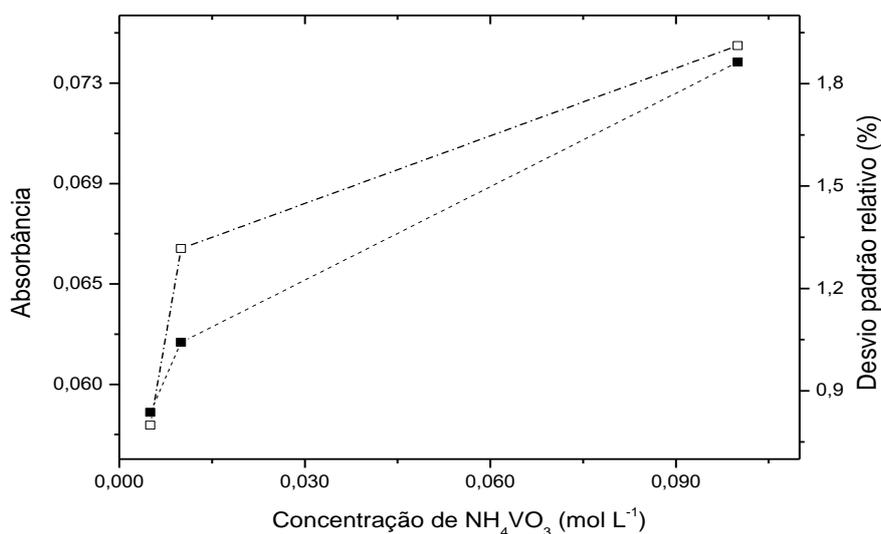


Figura 4.2 Efeito da concentração de metavanadato amônio (em ácido sulfúrico 1,0 mol.L^{-1}). Absorbância (---■---) e desvio padrão relativo (---□---).

Foi estudado o efeito da variação da concentração do carregador (ácido sulfúrico), fixando-se a concentração de metavanadato amônio ($5,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e variou-se a concentração da solução carregadora. As concentrações avaliadas para a solução carregadora foram $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Observou-se na Figura 4.3, um aumento do sinal analítico proporcional ao aumento da concentração da solução do carregador. A concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ foi selecionada, considerando-se o maior sinal em analítico. Observou-se que para baixas concentrações da solução de ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), ocorre uma diminuição na precisão do sinal analítico, evidenciado pelos valores de desvio padrão relativo acima do aceitável (respectivamente 6,11% e 9,23%) provavelmente devido a falta do ácido para completar a reação química.

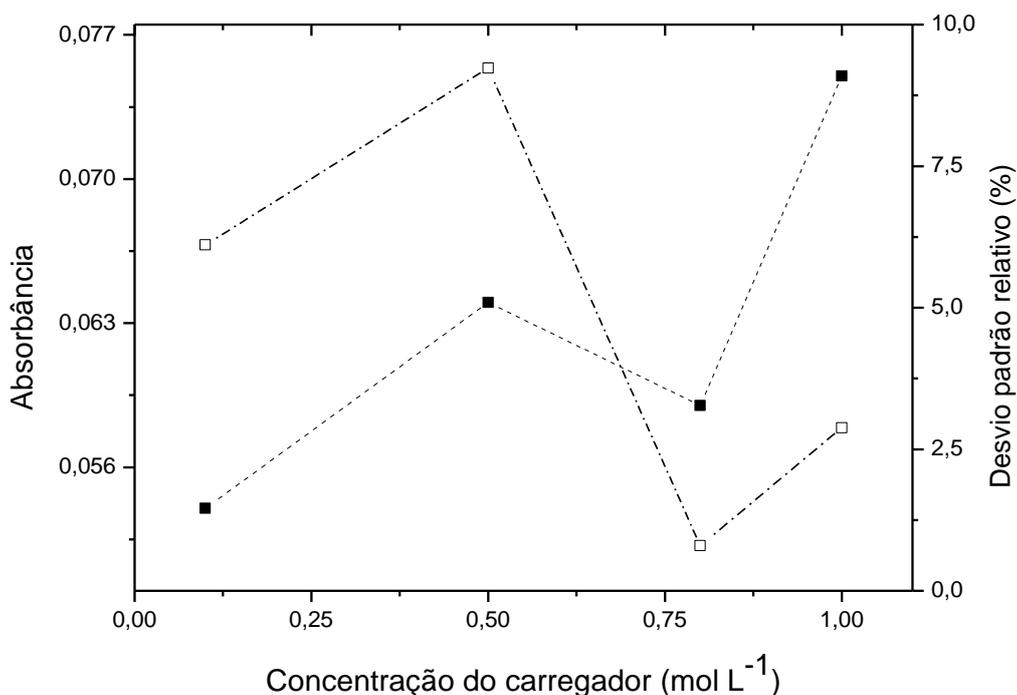


Figura 4.3 Efeito da concentração do carregador (H_2SO_4) na determinação de peróxido de hidrogênio. Absorbância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

4.1.2 Estudos dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio.

Os parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo foram otimizados utilizando o método univariado, buscando o melhor compromisso entre absorbância, reprodutibilidade e frequência analítica.

Foi avaliado o efeito do comprimento da bobina reacional de 40, 60 e 100 cm sobre o sinal analítico de uma solução de peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (Figura 4.4). Selecionou-se a bobina reacional com comprimento de 40 cm, considerando um aumento no sinal analítico e um desvio padrão relativo aceitável de 3,6%, devido o aumento do comprimento da bobina reacional proporciona um aumento no tempo de residência da amostra com aumento da zona de amostra dispersa.

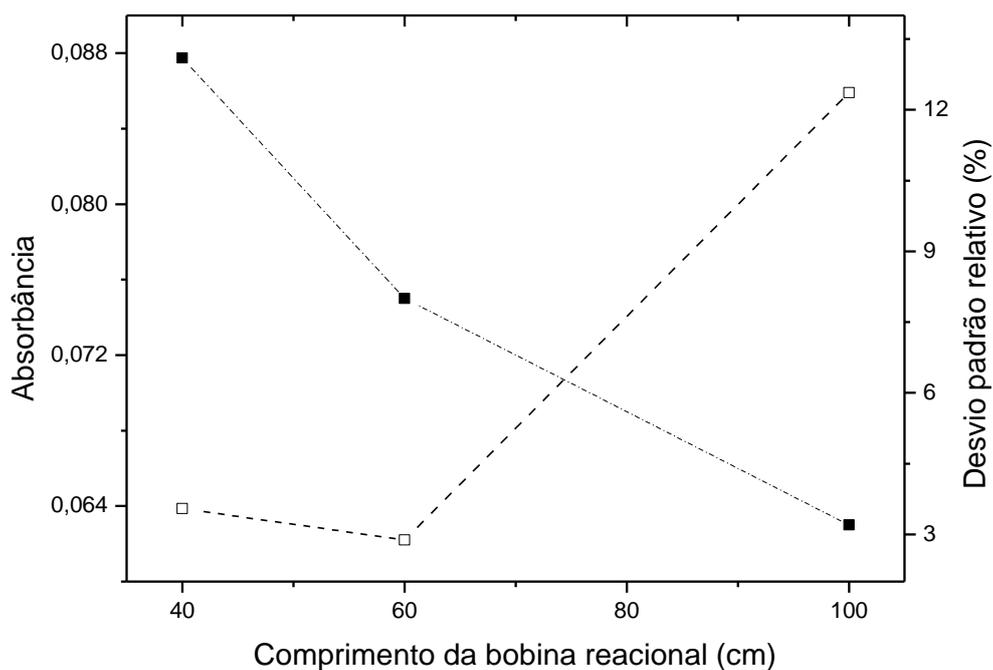


Figura 4.4 Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de peróxido de hidrogênio sobre o sinal analítico. Absorbância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

O efeito do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico foi avaliado nos comprimentos de 50, 150 e 300 μL (Figura 4.5). Verificou-se o aumento do sinal

analítico com o aumento do volume da alça de amostragem. Selecionou-se o volume de 300 μL , embasando-se no fato de o desvio padrão relativo para o volume da alça de amostragem de 150 μL ser aproximadamente 4 vezes maior que o desvio padrão relativo para a alça de amostragem de 300 μL .

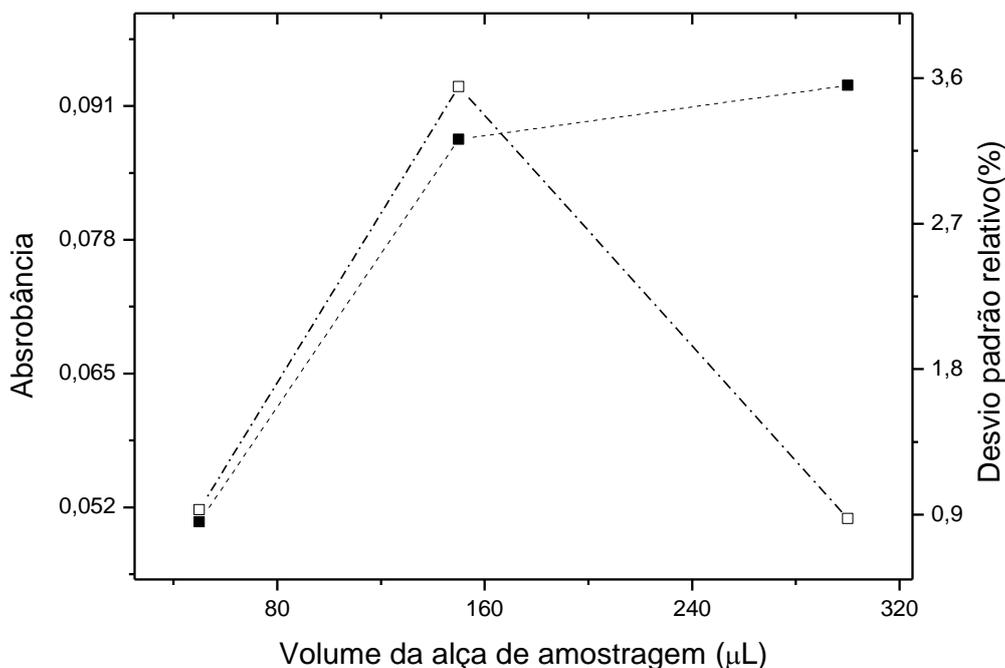


Figura 4.5 Efeito do volume da alça de amostragem. Absorbância (--■--) e desvio padrão relativo(--□--).

O efeito da vazão do fluido carregador (ácido sulfúrico) sobre o sinal analítico foi investigado (Figura 4.6). Verificou-se que para as vazões 0,09, 1,5 e 2,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ o sinal analítico não variou e os desvios padrões foram aceitáveis. Portanto, para aumentar a frequência analítica e aumentar o tempo útil da bomba peristáltica selecionou-se a vazão de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o fluido carregador.

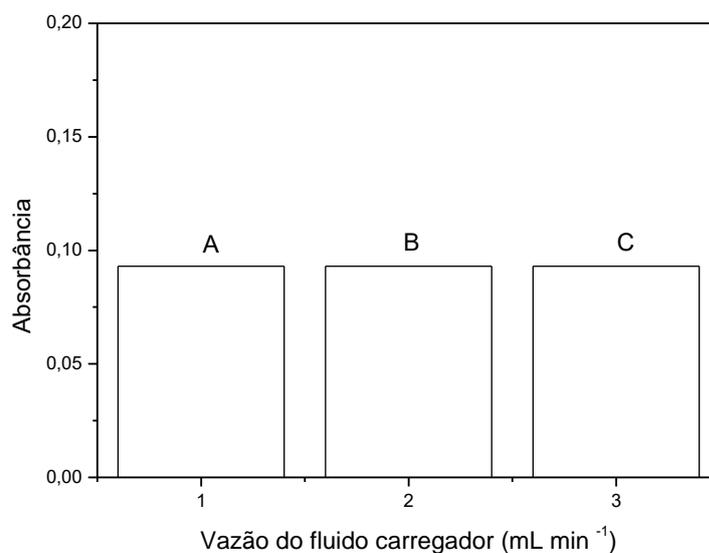


Figura 4.6 Efeito da vazão do fluido carregador na bomba peristáltica na determinação de peróxido de hidrogênio. A (0,09 mL.min⁻¹), B (1,5 mL.min⁻¹), C (2,0 mL.min⁻¹). Desvios padrão relativos para as vazões estudadas foram inferiores a 0,050% (n=3).

Os parâmetros estudados e selecionados na otimização do sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio encontra-se resumido na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de peróxido de hidrogênio

| Parâmetro | Estudado | Selecionado |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| NH ₄ VO ₃ (mol.L ⁻¹) | 0,1 - 0,001 - 0,005 | 0,005 |
| H ₂ SO ₄ (mol.L ⁻¹) | 0,1 - 0,5 - 0,8 - 1,0 | 1,0 |
| Bobina reacional (cm) | 40 - 60 - 100 | 40 |
| Alça de amostragem (μL) | 50 - 150 - 300 | 300 |
| Vazão do carregador (mL.min ⁻¹) | 0,09 - 1,5 - 2,0 | 1,5 |

4.1.3 Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais.

A curva analítica (Figura 4.7) foi obtida por injeções em triplicata de solução de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações ($7,40 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ a $7,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹). A solução de metavanadato de amônio quanto às soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas diariamente. A Figura 3.1 representa a figura esquemática para a análise por injeção em fluxo proposta, bem como os parâmetros utilizados. O procedimento proposto apresentou uma faixa linear variando de $7,40 \times 10^{-4}$ a $7,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ com desvios padrões relativos inferiores a 2,3%. A curva analítica obtida com o procedimento proposto pode ser descrita pela equação $Abs=62,82 \times C (\pm 1,13) + 0,015 (\pm 0,0050)$; $r=0,998$, onde Abs representa absorbância, C é a concentração de peróxido de hidrogênio em mol.L⁻¹ e r é o coeficiente de correlação linear.

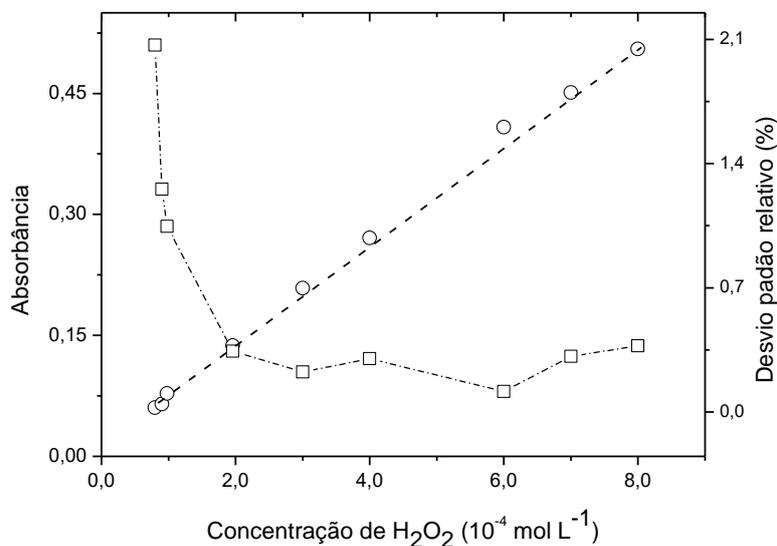


Figura 4.7 Curva analítica para a determinação de peróxido de hidrogênio. Absorbância (--○--) e desvio padrão relativo (--□--).

Os parâmetros de confiabilidade analítica avaliados foram, limite de detecção, limite de quantificação e faixa linear do procedimento proposto, os mesmos encontram-se apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de peróxido de hidrogênio

| Faixa linear mol.L ⁻¹ | Limite de Detecção ^(a) mol.L ⁻¹ | Limite de Quantificação ^(b) mol.L ⁻¹ |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| $7,40 \times 10^{-4}$ a $7,40 \times 10^{-3}$ | $2,40 \times 10^{-4}$ | $7,40 \times 10^{-4}$ |

^(a) 3×desvio padrão do branco/sensibilidade;

^(b) 10×desvio padrão do branco/sensibilidade.

Para o estudo de repetibilidade (Figura 4.8), os desvios padrões relativos foram menores que 1,2% (n=10) para soluções padrão de peróxido de hidrogênio $1,96 \times 10^{-3}$ e $4,00 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, afirmando por sua vez a repetibilidade do procedimento proposto.

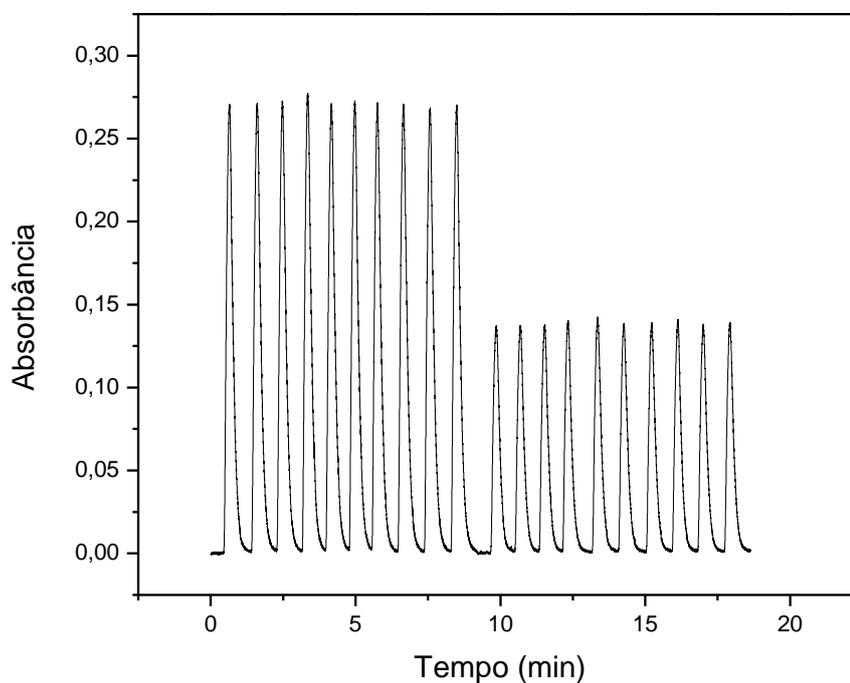


Figura 4.8 Diagrama obtido no estudo de repetibilidade para determinação de H₂O₂ $4,00 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $1,96 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, respectivamente.

O sistema de análise por injeção em fluxo proposto no presente trabalho, para a determinação de peróxido de hidrogênio, foi comparado com o sistema em fluxo por multicomutação proposto por SOUZA *et al.*³⁴ Ambos os procedimentos utilizaram 300µL de volume de amostragem por determinação e a frequência de amostragem para o método proposto foi de 60 determinações por hora, enquanto que a frequência de amostragem para o método proposto por SOUZA *et al.*³⁴ foi de 92 determinações por hora. Esta diferença se deve ao fato de o sistema em fluxo proposto por SOUZA *et al.*³⁴ operar for multicomutação.

O procedimento FIA desenvolvido apresentou limite de detecção de $2,41 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, enquanto o limite de detecção para o procedimento proposto por SOUZA *et al.*³⁴ foi de $1,80 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Portanto, não se observa diferença significativa neste parâmetro, evidenciando-se por sua vez a sensibilidade do procedimento desenvolvido. A Tabela 4.3 apresenta os resultados comparativos entre o sistema de análise por injeção em fluxo desenvolvido e o sistema proposto por SOUZA *et al.*³⁴. O procedimento proposto apresentou uma frequência de amostragem menor, mas adequada para aplicação em laboratórios que necessitem automatizar a identificação e quantificação de H₂O₂ nas amostras.

Tabela 4.3 - Comparação entre métodos de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio.

| Parâmetro | Sistema FIA desenvolvido | SOUZA, <i>et al.</i> (2014) |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Faixa linear/ mol.L ⁻¹ | $7,40 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ | $2,9 \times 10^{-4}$ a $5,9 \times 10^{-3}$ |
| Limite de detecção/mol.L ⁻¹ | $2,40 \times 10^{-4}$ | $1,8 \times 10^{-4}$ |
| Limite de quantificação/ mol.L ⁻¹ | $7,40 \times 10^{-4}$ | $6,0 \times 10^{-4}$ |
| Frequência de amostragem/ (determinações.h ⁻¹) | 60 | 92 |
| Volume de amostra/ µL | 300 | 300 |

4.1.4 Estudo de recuperação de H₂O₂ em amostras comercial de água oxigenada empregando sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica.

No estudo de recuperação de H₂O₂, soluções de referência de peróxido de hidrogênio de diferentes concentrações foram adicionadas a soluções de amostras comerciais de água oxigenada fortificadas com peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Os resultados obtidos da determinação de H₂O₂ empregando o procedimento proposto, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4- Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em formulações comerciais empregando o procedimento em fluxo proposto.

| Amostra | H ₂ O ₂ /mol.L ⁻¹ | | Recuperação/% |
|---------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| | Adicionado | Encontrado ^a | |
| A | $5,68 \times 10^{-3}$ | $5,44 \times 10^{-3} \pm 1,30 \times 10^{-3}$ | 95,8 |
| | $6,61 \times 10^{-3}$ | $6,09 \times 10^{-3} \pm 1,40 \times 10^{-3}$ | 92,1 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $6,70 \times 10^{-3} \pm 6,18 \times 10^{-3}$ | 90,6 |
| B | $5,68 \times 10^{-3}$ | $5,29 \times 10^{-3} \pm 4,55 \times 10^{-3}$ | 93,1 |
| | $6,61 \times 10^{-3}$ | $6,17 \times 10^{-3} \pm 2,09 \times 10^{-6}$ | 93,3 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $6,72 \times 10^{-3} \pm 1,51 \times 10^{-3}$ | 90,8 |
| C | $5,68 \times 10^{-3}$ | $4,45 \times 10^{-3} \pm 1,41 \times 10^{-3}$ | 78,3 |
| | $6,61 \times 10^{-3}$ | $5,17 \times 10^{-3} \pm 4,47 \times 10^{-3}$ | 77,4 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $6,20 \times 10^{-3} \pm 2,51 \times 10^{-3}$ | 83,7 |
| D | $5,68 \times 10^{-3}$ | $5,50 \times 10^{-3} \pm 7,76 \times 10^{-5}$ | 96,8 |
| | $6,61 \times 10^{-3}$ | $6,75 \times 10^{-3} \pm 1,79 \times 10^{-4}$ | 102 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $8,09 \times 10^{-3} \pm 2,21 \times 10^{-4}$ | 109 |

* n=3; média ± desvio padrão.

Diante dos resultados, procedeu-se a determinação de peróxido em amostras comerciais empregando-se o método de compatibilização de matriz. Neste procedimento, a solução de amostra é preparada num meio semelhante aquele em que ela vai ser determinada. Em nosso caso, empregamos uma solução de amostra como diluente. Verificou-se uma melhoria na linearidade da curva obtida por compatibilização de matriz quando comparada com a própria curva analítica do procedimento proposto. Contudo, nem o resultado obtido por adição de padrão e o resultado da compatibilização de matriz foram aqueles adicionados na amostra inicialmente. Com isso, maiores estudos deverão ser realizados para verificação da exatidão do procedimento desenvolvido para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais de água oxigenada.

4.1.5 Determinação de peróxido de hidrogênio em amostra comercial de água oxigenada 3% empregando permanganometria.

A média dos volumes gastos na titulação por permanganometria para a amostra de peróxido de hidrogênio foi 7,60 mL de solução de permanganato $0,0895 \text{ mol.L}^{-1}$; a reação química entre o íon permanganato e o peróxido de hidrogênio possui estequiometria 2:5 respectivamente, logo, o número de mols de peróxido de hidrogênio contidos na amostra corresponde a $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol}$.

O volume de amostra de peróxido utilizado para o procedimento foi de 2,0 mL, logo, a porcentagem de peróxido determinada experimentalmente empregando a permanganometria foi de 2,89% ($0,85 \text{ mol.L}^{-1}$).

4.1.6 Estudo de recuperação de H_2O_2 em amostras de leite UHT empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica proposto.

No estudo de recuperação do H_2O_2 , diferentes soluções de referência de peróxido de hidrogênio foram adicionadas a soluções de amostras de leite (marca A) fortificadas com peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e os resultados obtidos,

descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5- Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em amostra de leite (marca A).

| Amostra | $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{mol.L}^{-1}$ | | Recuperação/% |
|---------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| | Adicionado | Encontrado ^(a) | |
| Leite A | $2,82 \times 10^{-3}$ | $2,37 \times 10^{-3} \pm 2,09 \times 10^{-4}$ | 84,2 |
| | $5,68 \times 10^{-3}$ | $4,60 \times 10^{-3} \pm 5,80 \times 10^{-4}$ | 81,0 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $6,15 \times 10^{-3} \pm 6,98 \times 10^{-4}$ | 83,1 |

^(a) n=3; média \pm desvio padrão.

A curva de adição de padrão pode ser descrita pela equação $\text{Abs} = 0,050 (\pm 0,011) + 55,84 (\pm 3,83) \times C$; $r=0,990$, onde Abs representa absorvância, C é a concentração de peróxido de hidrogênio (mol.L^{-1}) e r é o coeficiente de correlação linear. A curva de adição de padrão é mostrada na Figura 4.9.

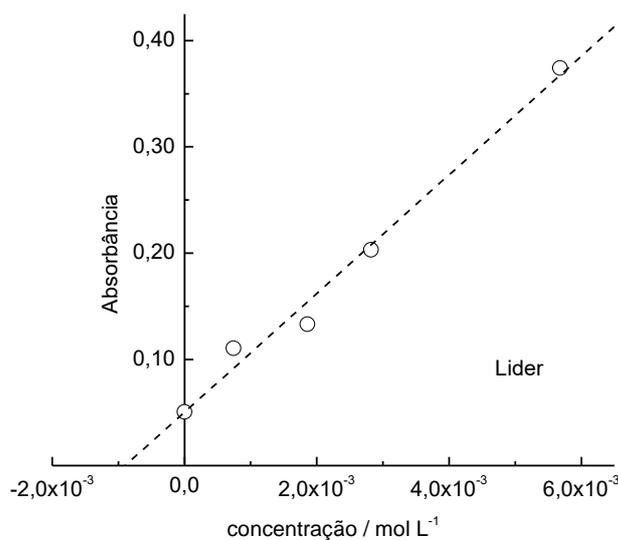


Figura 4.9 Curva de adição de padrão para a determinação de peróxido de hidrogênio empregando o sistema FIA proposto. Absorvância (--o--).

Analisando a equação da curva de adição de padrão, dividindo-se o coeficiente linear pelo coeficiente angular, encontra-se uma concentração de $9,05 \times 10^{-4} \pm 1,36 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ ($30,8 \pm 4,63$ mg de H₂O₂/L) na amostra, sabendo-se que foi adicionado $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ ($31,60$ mg de H₂O₂/L) na amostra, obtêm-se um erro relativo de -2,2%, ou seja, uma porcentagem de erro aceitável, levando em consideração a complexidade da matriz da amostra.

No teste de recuperação do analito, diferentes soluções de referência de peróxido de hidrogênio foram adicionadas a soluções de amostras de leite (marca B) fortificadas com peróxido de hidrogênio $9,29 \times 10^{-4}$ 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 4.6.

Tabela 4.6- Estudo de recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite (marca B).

| Amostra | H ₂ O ₂ /(mol.L ⁻¹) | | Recuperação/% |
|---------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| | Adicionado | Encontrado ^(a) | |
| Leite B | $2,82 \times 10^{-3}$ | $2,55 \times 10^{-3} \pm 4,90 \times 10^{-4}$ | 90,4 |
| | $5,68 \times 10^{-3}$ | $4,58 \times 10^{-3} \pm 5,31 \times 10^{-4}$ | 80,6 |
| | $7,40 \times 10^{-3}$ | $6,32 \times 10^{-3} \pm 3,68 \times 10^{-4}$ | 85,4 |

^(a) n=3; média \pm desvio padrão.

Realizou-se a adição de solução padrão de H₂O₂ em outra amostra de leite UHT e determinou-se a concentração pelo procedimento proposto e método de adição de padrão.

A curva de adição de padrão (Figura 4.9.1) pode ser descrita pela equação $Abs = 0,046 (\pm 0,0121) + 54,18 (\pm 2,73) \times C$; $r = 0,995$, onde Abs representa absorbância, C é a concentração de peróxido de hidrogênio (mol.L⁻¹) e r é o coeficiente de correlação linear. Analisando a equação da curva de adição de padrão, dividindo-se o coeficiente linear pelo coeficiente angular, encontra-se uma concentração de $8,63 \times 10^{-4} \pm 1,34 \times 10^{-4}$

mol.L⁻¹ ($29,35 \pm 4,56$ mg de H₂O₂/L) na amostra, sabendo-se que foi adicionado $9,29 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ (31,60 mg de H₂O₂/L) na amostra, obtêm-se um erro relativo de -6,7%, ou seja, uma porcentagem de erro aceitável, levando em consideração a complexidade da matriz da amostra.

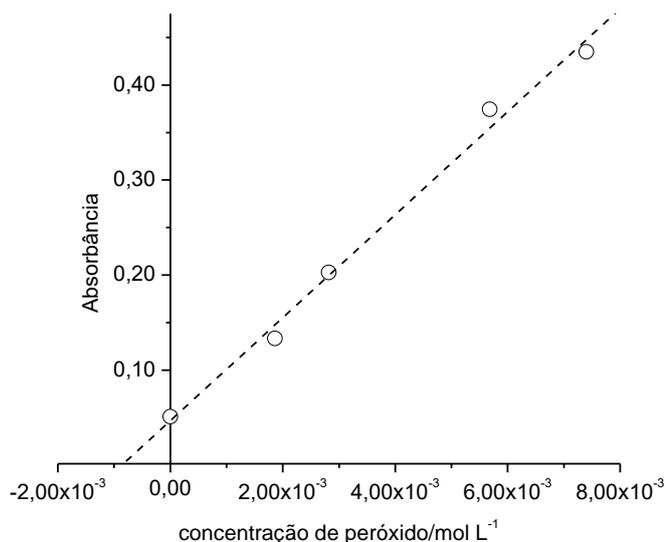
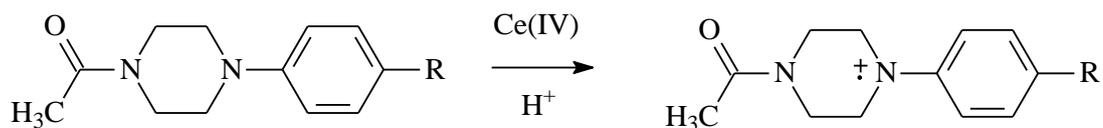


Figura 4.9.1 Curva de adição de padrão para a determinação de peróxido de hidrogênio no leite (marca B). Absorbância (---■---).

4.2 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas empregando Ce(IV) como reagente.

O procedimento proposto emprega a reação química entre o cetoconazol e o Ce(IV) em meio ácido, levando a formação de um produto reacional de coloração avermelhada.



(Equação 2)

Os espectros de absorção molecular do cetoconazol, solução de Ce(IV) e do produto de oxidação da reação química encontram-se na Figura 4.10. A substância oxidada apresenta uma absorção máxima em torno de 500 nm.

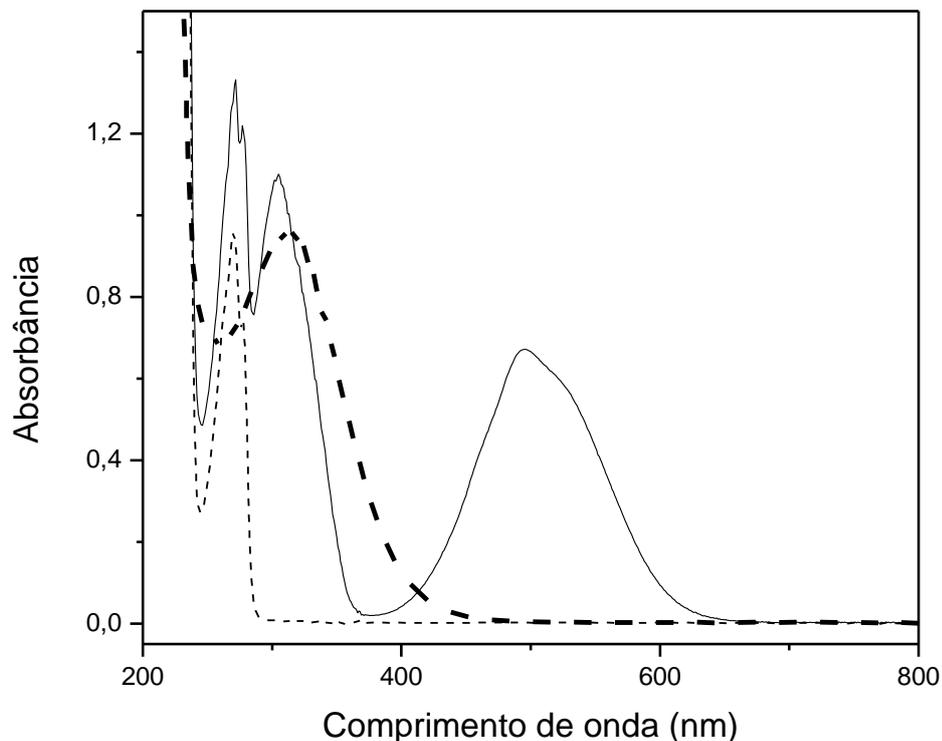


Figura 4.10 Espectro de absorção molecular do cetoconazol, do Ce(IV) e do produto de oxidação da reação química. [Cetoconazol]= $7,40 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ (---); [Ce(IV)]= $3,60 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ (- - -); [Cetoconazol]= $7,40 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ + [Ce(IV)]= $3,60 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ (—).

4.2.1 Estudo do efeito dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) sobre sinal analítico para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente.

Os parâmetros químicos foram otimizados univariavelmente, buscando a melhor relação entre sensibilidade e repetibilidade, bem como maior frequência analítica. A configuração do sistema de análise por injeção em fluxo reverso empregado na

otimização é ilustrado na Figura 3.2, com alça de amostragem de $125\mu\text{L}$ de Ce (IV) $6,0\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ injetados no sistema em fluxo por determinação, comprimento da bobina reacional de 25 cm. As vazões empregadas para a solução de amostra ou solução de referência de cetoconazol em H_2SO_4 $1,0\text{ mol.L}^{-1}$ foi de $1,9\text{ mL.min}^{-1}$.

Foi avaliado o efeito da concentração da solução de Ce (IV) sobre o sinal analítico (Figura 4.11). Para este estudo, fixou-se a concentração de solução de cetoconazol $7,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ (em ácido sulfúrico $0,10\text{ mol.L}^{-1}$), variou-se a concentração de cério(IV) e fixaram-se os demais parâmetros. As concentrações avaliadas de Ce(IV) foram $3,00\times 10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$, $2,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ e $3,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$, $6,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ e $9,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$. Selecionou-se a concentração de $6,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ para os demais experimentos embasando-se na observação que esta foi a concentração de Ce (IV) que obteve melhor relação entre sinal analítico e repetibilidade.

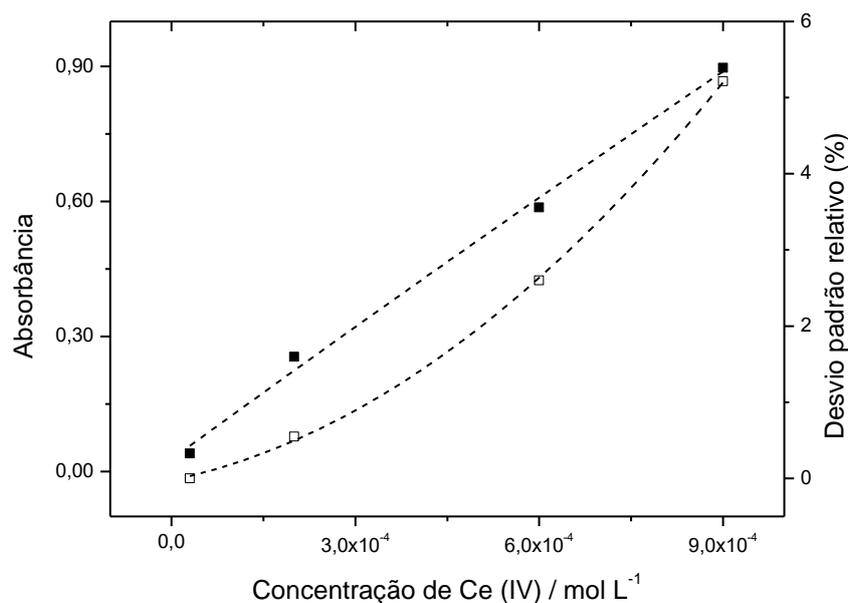


Figura 4.11 Efeito da concentração de Ce(IV) sobre o sinal analítico na determinação de cetoconazol empregando o procedimento FIA proposto. Absorvância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

Foi estudado o efeito da concentração de ácido sulfúrico utilizado como fluido carregador na resposta do sistema FIA proposto (Figura 4.12). Para isto, fixou-se a concentração de cetoconazol ($7,00\times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$) e variou-se a concentração de ácido sulfúrico nas seguintes concentrações 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e $1,0\text{ mol.L}^{-1}$). Selecionou-

se a concentração $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido sulfúrico para a solubilização do cetoconazol visto que o sinal analítico para as concentrações de ácido sulfúrico $0,9$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ foi praticamente o mesmo.

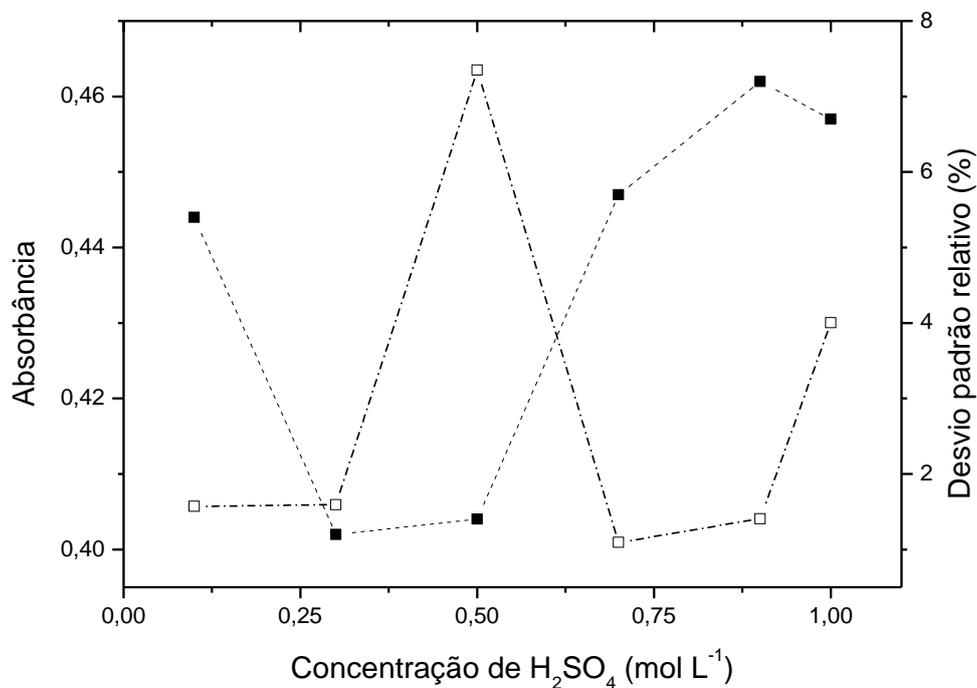


Figura 4.12 Efeito da concentração do ácido sulfúrico utilizado como fluido carregador. Absorbância (---■---) e desvio padrão relativo (---□---).

4.2.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) sobre o sinal analítico para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente.

Foi avaliado o efeito do comprimento da bobina reacional no sinal analítico de 13,5, 25 e 40 cm (Figura 4.13). Verificou-se um maior sinal analítico no comprimento de onda de 25 cm. No comprimento de 40 cm, a dispersão da amostra foi mais efetiva, ocasionando uma diminuição do sinal analítico. Selecionou-se a bobina reacional com

comprimento de 25 cm, devido este comprimento ter apresentado maior sinal analítico e o menor desvio padrão relativo.

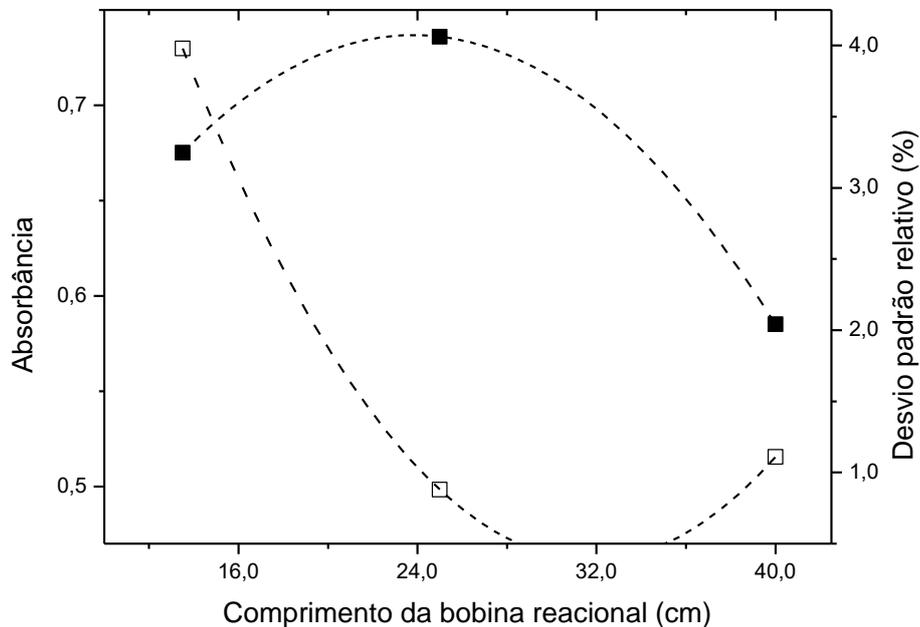


Figura 4.13 Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico na determinação de cetoconazol utilizando Ce (IV) como reagente. Absorvância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

O efeito do volume da alça de amostragem sobre a absorvância foi avaliada nos comprimentos de 50, 75, 100 e 125 μL (Figura 4.14). Verificou-se um aumento do sinal analítico com o aumento do volume de amostragem até 125 μL , com o conseqüente aumento da precisão das medidas. Selecionou-se o volume de 125 μL , visto que para este volume, obteve-se o maior sinal analítico e o menor desvio padrão relativo, além de contornar o problema de formação de pico duplo.

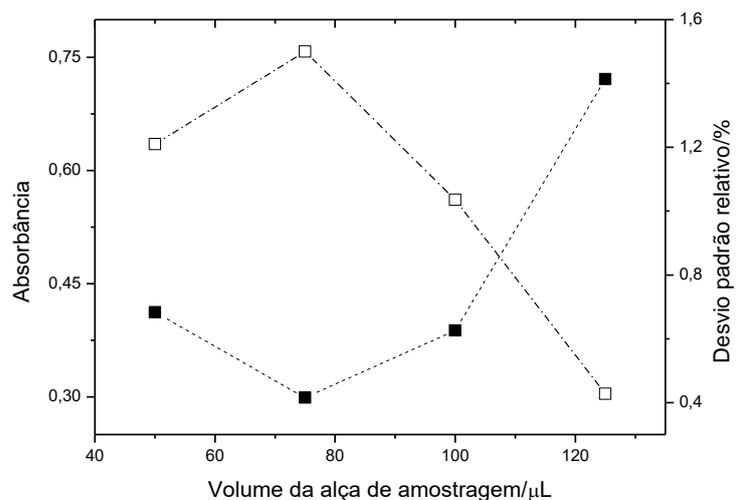


Figura 4.14 Efeito do volume da Alça de amostragem na determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente. Absorbância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

Foi estudado o efeito da vazão do fluxo carregador sobre o sinal analítico (Figura 4.15). Embora a vazão $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ tenha apresentado o menor desvio padrão relativo, selecionou-se a vazão de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, devido ao fato de aumentar o tempo útil de vida da bomba peristáltica e ao fato da diferença entre o sinal analítico e das vazões de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ser de apenas 2,9%.

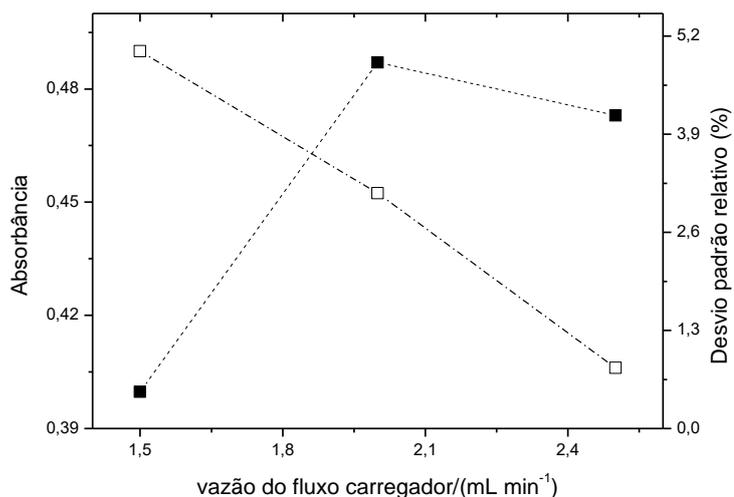


Figura 4.15 Efeito da vazão da bomba peristáltica na determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente. Absorbância (--■--) e desvio padrão relativo (--□--).

Os parâmetros estudados na otimização do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente encontram-se resumidos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7- Parâmetros químicos e físicos estudados e selecionados do sistema FIA proposto para determinação de cetoconazol

| Parâmetro | Estudado | Selecionado |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|
| Ce(IV)/mol.L ⁻¹ | 3,00×10 ⁻⁵ - 9,50×10 ⁻⁴ | 6,00×10 ⁻⁴ |
| Carregador/mol. L ⁻¹ | 0,1 - 1,0 | 1,0 |
| Bobina reacional/cm | 13,5 - 25 - 40 | 25 |
| Alça de amostragem/ µL | 50 - 75 - 100 - 125 | 125 |
| Vazão do carregador/(mL.min ⁻¹) | 1,5 - 2,0 - 2,5 | 2,0 |

4.2.3 Parâmetros de confiabilidade analítica do sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente.

A curva analítica (Figura 4.16) foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de solução de Ce(IV) 6,00×10⁻⁴ mol.L⁻¹ em diferentes concentrações de solução de cetoconazol (6,00×10⁻⁵ mol.L⁻¹ a 9,50×10⁻⁵ mol.L⁻¹). A Figura 3.2 representa a figura esquemática para a análise por injeção em fluxo reverso proposta, bem como os parâmetros utilizados. O procedimento proposto apresentou uma faixa linear variando de 6,00×10⁻⁵ a 9,50×10⁻⁵ mol.L⁻¹, e desvios padrões relativos inferiores a 1,0%. A curva analítica pode ser descrita pela equação $Abs=2.577,36 \times C(\pm 109,2) + 0,030(\pm 0,009)$; $r=0,997$, $F=556,14$; $F(1;4;99)=7,71$, onde Abs representa absorvância, C é a concentração de cetoconazol (mol.L⁻¹) e r é o coeficiente de correlação linear.

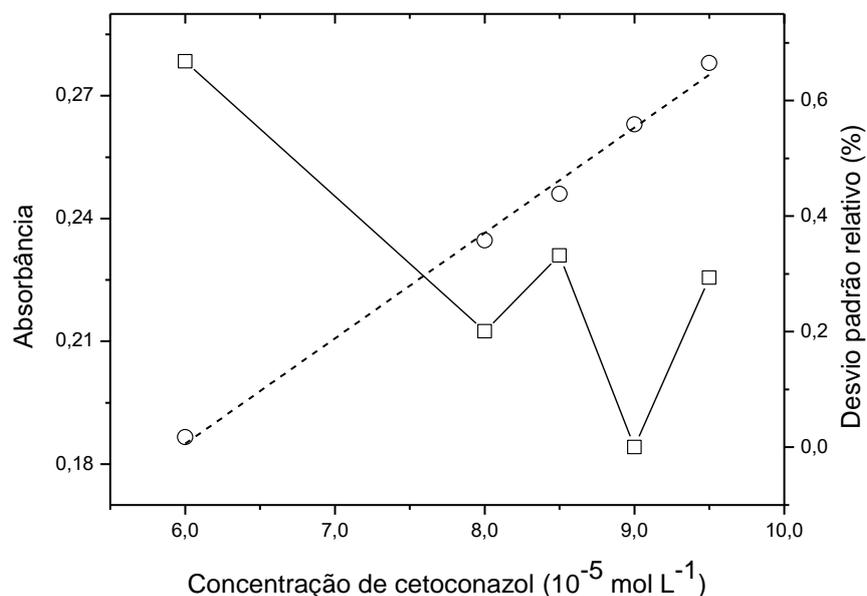


Figura 4.16 Curva analítica para a determinação de cetoconazol utilizando procedimento FIA proposto empregando Ce(IV) como reagente. Absorbância (-○-) e desvio padrão relativo (-□-).

Os parâmetros de confiabilidade avaliados encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8- Parâmetros de confiabilidade do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para determinação de cetoconazol utilizando Ce (IV) como reagente.

| Parâmetro | Encontrado |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Faixa linear/(mol.L ⁻¹) | $6,0 \times 10^{-5}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ |
| Limite de detecção/(mol.L ⁻¹) ^a | $1,05 \times 10^{-5}$ |
| Limite de quantificação/(mol.L ⁻¹) ^b | $3,50 \times 10^{-5}$ |
| Desvio padrão relativo/% | <4,2 |

^(a) 3 vezes desvio padrão do branco/sensibilidade;

^(b) 10 vezes o desvio padrão do branco/sensibilidade.

O desvio padrão relativo para o estudo de repetibilidade para a solução de cetoconazol $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ foi de 4,13% (n = 10). A Figura 4.17 representa o fiograma obtido para as soluções de cetoconazol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

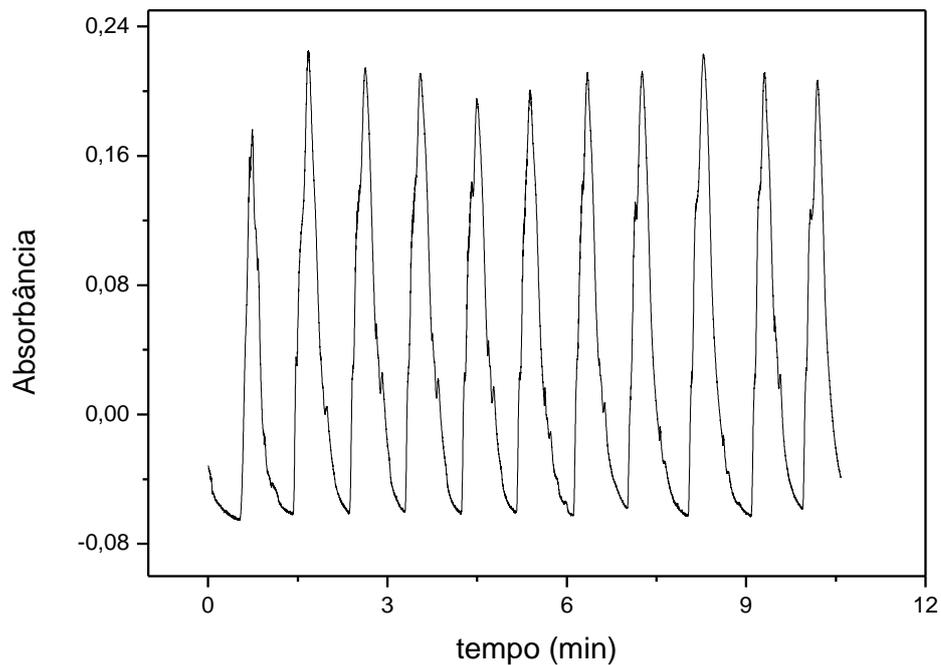


Figura 4.17 Fiagrama obtido no estudo de repetibilidade empregando o procedimento proposto na determinação de cetoconazol $1,00 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ utilizando Ce(IV) como reagente.

O desvio padrão relativo para o estudo de repetibilidade para a solução de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ foi de 4,2% ($n = 10$). A Figura 4.18 representa o fiagrama obtido para as para soluções de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹.

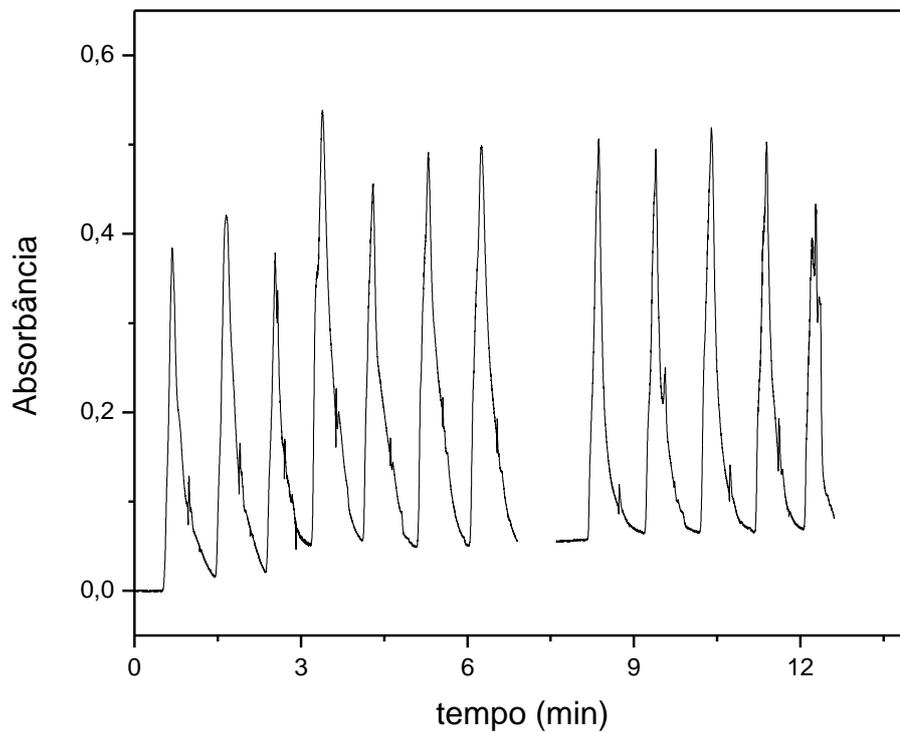


Figura 4.18 Fiagrama obtido no estudo de repetibilidade empregando o procedimento proposto na determinação de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ utilizando Ce(IV) como reagente.

O sistema de análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) proposto para a determinação de cetoconazol utilizando Ce(IV) como reagente foi comparado com os métodos propostos por FRAIHAT³⁵ e por FRAIHT & BAHGAT³⁶, os dados para comparação encontram-se na Figura 4.19.

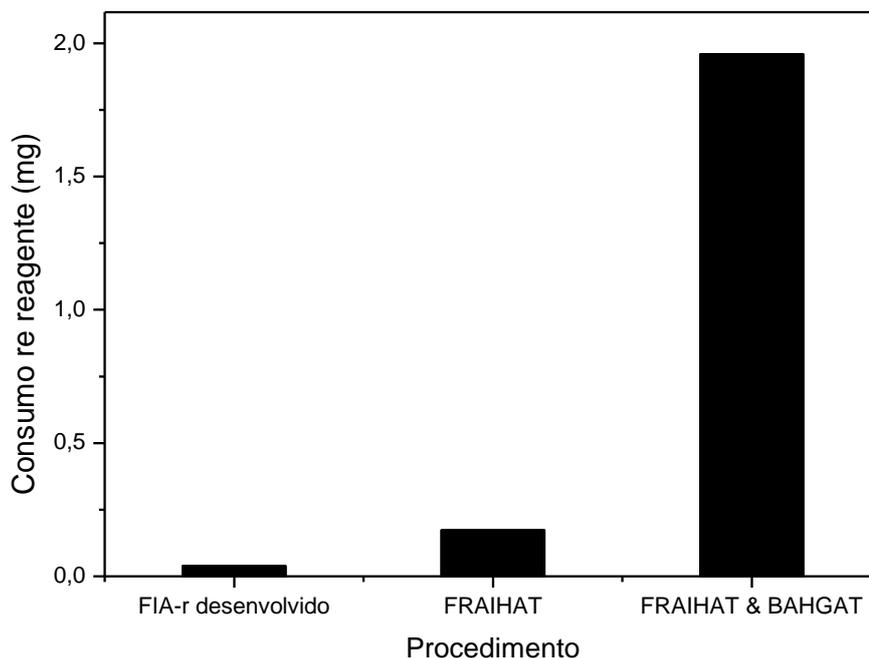


Figura 4.19 Consumo de reagente (Ce (IV)) por determinação para cada procedimento.

No procedimento de análise por injeção seqüencial (SIA) proposto por FRAIHT²⁷, o consumo do reagente foi de 0,174 mg de Ce (IV) por determinação. No sistema de análise em fluxo desenvolvido no presente trabalho, o consumo de reagente foi de 0,04 mg de Ce (IV) por determinação. Portanto, observa-se que o procedimento FIA-r desenvolvido proporcionou um consumo de reagente aproximadamente 4,3 vezes menor que o consumo de reagente proposto por FRAIHT³⁵.

No procedimento em batelada proposto por FRAIHT & BAHGAT³⁶, o consumo de reagente foi de 1,96 mg de Ce(IV) por determinação. Portanto, observa-se que o método FIA-r proposto no presente trabalho proporcionou um consumo de reagente aproximadamente 48 vezes menor que o consumo de reagente proposto por FRAIHT & BAHGAT³⁶.

Outra observação a ser destacada para o sistema em fluxo proposto refere-se aos parâmetros de confiabilidade, que podem ser comparados com referencial bibliográfico e encontram-se na Tabela 4.9.

Tabela 4.9- Comparação entre os Parâmetros de confiabilidade do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para determinação de cetoconazol utilizando Ce (IV) como reagente.

| Autores | Faixa Linear/ (mol.L⁻¹) | Limite de detecção/ (mol.L⁻¹) | Limite de quantificação/(mol.L⁻¹) |
|----------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| FRAIHT ²⁷ | 3,60×10 ⁻⁵ a 2,20×10 ⁻⁴ | 2,40×10 ⁻⁵ | 8,00×10 ⁻⁵ |
| Sistema proposto | 6,00×10 ⁻⁵ a 9,50×10 ⁻⁵ | 1,00×10 ⁻⁵ | 3,50×10 ⁻⁵ |

Podemos observar, analisando a Tabela 4.9, que o limite de detecção para o método FIA-r desenvolvido foi aproximadamente 240% menor que o limite de detecção da referência citada e o limite de quantificação foi aproximadamente 228% menor que o limite de quantificação da referência citada .

4.2.4 Estudo de recuperação de cetoconazol utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica e Ce (IV) como reagente.

Avaliou-se o efeito da matriz de amostra na determinação do cetoconazol estudando-se a recuperação do analito. Diferentes alíquotas de soluções de referência de cetoconazol foram adicionadas a soluções de amostras e os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- Estudo de recuperação de cetoconazol em formulações farmacêuticas comerciais empregando o procedimento proposto.

| Amostra | Cetoconazol/(mol.L ⁻¹) | | Recuperação/% |
|---------|------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| | Adicionado | Encontrado ^(a) | |
| A | 6,00×10 ⁻⁵ | 4,57×10 ⁻⁵ ± 2,16×10 ⁻⁴ | 76,2 |
| A | 7,00×10 ⁻⁵ | 5,35×10 ⁻⁵ ± 5,16×10 ⁻⁴ | 76,4 |
| A | 8,50×10 ⁻⁵ | 6,85×10 ⁻⁵ ± 8,39×10 ⁻⁴ | 80,6 |
| B | 6,00×10 ⁻⁵ | 5,56×10 ⁻⁵ ± 6,45×10 ⁻⁴ | 92,7 |
| B | 7,00×10 ⁻⁵ | 6,79×10 ⁻⁵ ± 1,14×10 ⁻³ | 97,0 |
| B | 9,00×10 ⁻⁵ | 7,64×10 ⁻⁵ ± 7,55×10 ⁻⁴ | 84,9 |
| C | 6,00×10 ⁻⁵ | 4,42×10 ⁻⁵ ± 2,48×10 ⁻³ | 82,0 |
| C | 7,00×10 ⁻⁵ | 6,25×10 ⁻⁵ ± 1,89×10 ⁻³ | 89,3 |
| C | 8,00×10 ⁻⁵ | 7,06×10 ⁻⁵ ± 1,55×10 ⁻³ | 88,3 |
| C | 9,00×10 ⁻⁵ | 7,09×10 ⁻⁵ ± 1,33×10 ⁻³ | 78,8 |
| D | 6,00×10 ⁻⁵ | 2,96×10 ⁻⁵ ± 2,01×10 ⁻³ | 49,4 |
| D | 7,00×10 ⁻⁵ | 4,00×10 ⁻⁵ ± 2,17×10 ⁻⁴ | 57,2 |
| D | 8,00×10 ⁻⁵ | 5,17×10 ⁻⁵ ± 2,20×10 ⁻⁴ | 64,6 |
| D | 9,00×10 ⁻⁵ | 5,20×10 ⁻⁵ ± 1,74×10 ⁻³ | 57,7 |

^(a) n=3; média ± desvio padrão.

Como podemos observar, de acordo com os dados dispostos na Tabela 4.10, obteve-se valores experimentais fora dos limites aceitáveis (80% - 110%) para o ensaio de recuperação do analito, evidenciando por sua vez a presença do efeito de matriz da amostra.

4.2.5 Comparação entre a curva analítica para o sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação o cetoconazol e as curvas analíticas para adição de padrão das amostras (A e B).

A curva analítica para determinação de cetoconazol (Figura 4.20) foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de solução de Ce(IV) 6,00×10⁻⁴ mol.L⁻¹ em diferentes concentrações de solução de cetoconazol (6,00×10⁻⁵ mol.L⁻¹ a 9,50×10⁻⁵ mol.L⁻¹). A Figura 3.2 representa a figura esquemática para a análise por injeção em fluxo reverso proposta, bem como os parâmetros utilizados. O procedimento proposto apresentou uma

faixa linear variando de $6,00 \times 10^{-5}$ a $9,50 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, e desvios padrões relativos inferiores a 1,0%. A curva analítica pode ser descrita pela equação $Abs = 2.391,69 (\pm 197,40) \times C + 0,0481 (\pm 0,015)$; $r = 0,988$, onde Abs representa absorvância, C é a concentração de cetoconazol (mol.L⁻¹) e r é o coeficiente de correlação linear.

A curva de adição de padrão da amostra A (Figura 4.21) foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de solução de Ce(IV) $6,00 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em diferentes concentrações de solução de cetoconazol ($6,00 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ a $9,00 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) em volumes fixos de amostra. A Figura 3.2 representa a figura esquemática para a análise por injeção em fluxo reverso proposta, bem como os parâmetros utilizados.

A curva de adição de padrão para a amostra A pode ser descrita pela equação $Abs = 2402,72 (\pm 69,64) \times C + 0,0875 (\pm 0,0045)$; $r = 0,999$, onde Abs representa absorvância, C é a concentração de cetoconazol (mol.L⁻¹) e r é o coeficiente de correlação linear. Os desvios padrões relativos foram inferiores a 0,5%. A concentração de cetoconazol na amostra corresponde a $3,64 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

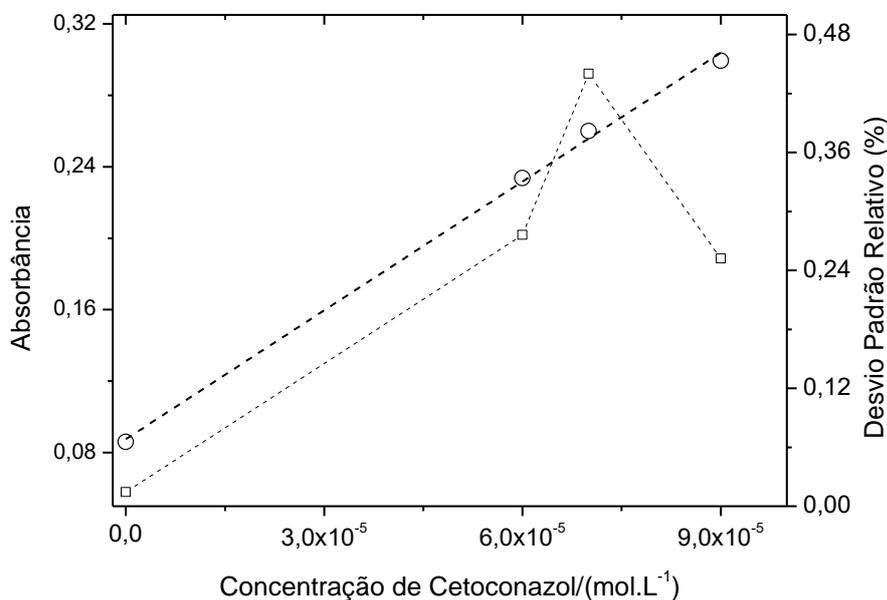


Figura 4.20 Curva de adição de padrão para a determinação de cetoconazol (na amostra A) utilizando Ce(IV) como reagente. Absorbância (-○-) e desvio padrão relativo (-□-).

A massa de cetoconazol fornecida pelo fabricante da amostra A corresponde a 200 mg por comprimido, o valor experimental encontrado utilizando o procedimento de

análise por injeção em fluxo reverso desenvolvido foi de 242 mg por comprimido. O valor encontrado foi aproximadamente 21,0% maior que o valor fornecido pelo fabricante, como todo medicamento possui data de validade definida, o fabricante tem o dever de garantir que até o prazo de validade, a composição seja aquela indicada no rótulo, isso justifica a diferença entre os valores (experimental e teórico) e portanto, a massa de cetoconazol por comprimido indicada pelo fabricante deve ser maior do que os 200 mg por comprimido.

A curva de adição de padrão da amostra B (Figura 4.22) foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de solução de Ce (IV) $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes concentrações de solução de cetoconazol ($6,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $9,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em volumes fixos de amostra. A Figura 3.2 representa a figura esquemática para a análise por injeção em fluxo reverso proposta, bem como os parâmetros utilizados.

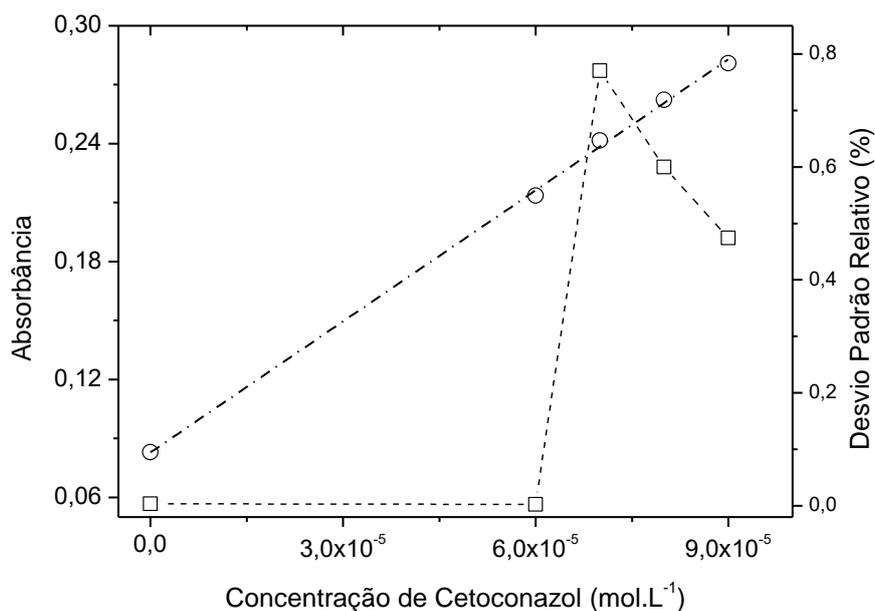


Figura 4.21 Curva de adição de padrão para a determinação de cetoconazol (na amostra B) utilizando Ce(IV) como reagente. Absorbância (-o-) e desvio padrão relativo (-□-).

A curva de adição de padrão para a amostra B pode ser descrita pela equação $Abs = 2222,57 (\pm 39,31) \times C + 0,0829 (\pm 0,0027)$, $r = 0,999$, onde Abs representa absorbância, C é a concentração de cetoconazol (mol.L^{-1}) e r é o coeficiente de

correlação linear. Os desvios padrões relativos foram inferiores a 1,0%. A concentração de cetoconazol na amostra corresponde a $3,73 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Analisando a Tabela 4.11, observa-se que não há diferença significativa quanto a sensibilidade.

Tabela 4.11- Comparação entre os coeficientes angulares da curva analítica e das curvas de adição de padrão.

| Curva | Coefficiente angular |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|
| Curva analítica | 2.391,69 ($\pm 197,41$) |
| Curva de adição de padrão para a amostra A | 2.402,72 ($\pm 69,64$) |
| Curva de adição de padrão para a amostra B | 2.222,57 ($\pm 39,31$) |

A massa de cetoconazol fornecida pelo fabricante da amostra B corresponde a 200 mg por comprimido, o valor experimental encontrado utilizando o procedimento de análise por injeção em fluxo reverso desenvolvido foi de 248 mg por comprimido. O valor encontrado foi aproximadamente 24% maior que o valor fornecido pelo fabricante, esta diferença entres os valores pode estar associada a data de validade do fármaco.

4.2.6 Análise comparativa para a determinação de cetoconazol em comprimidos.

Inicialmente, foi registrado espectro de emissão de uma solução padrão de cetoconazol $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (em meio de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$) conforme mostrado na Figura 4.23. A substância quando excitada no comprimento de onda de 225 nm apresenta emissão máxima em torno de 380 nm .

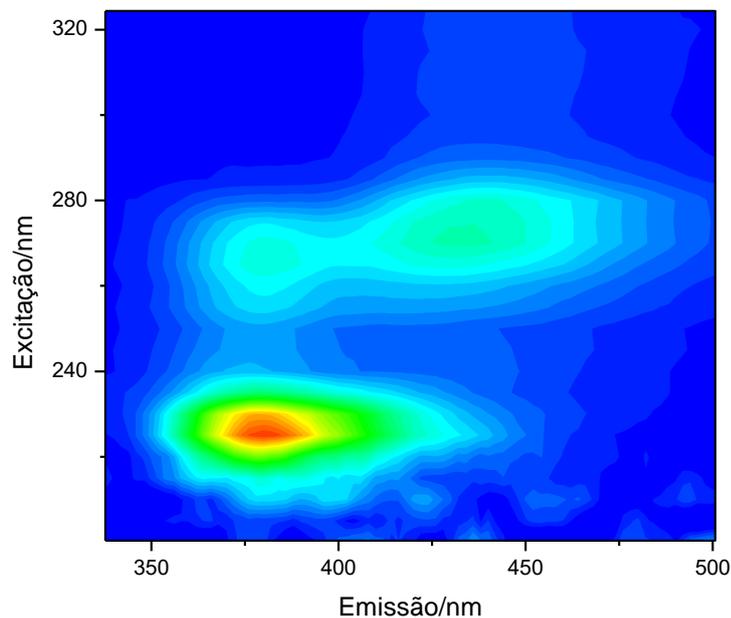


Figura 4.22 Espectro de emissão de uma solução padrão de cetconazol $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$).

O espectro de emissão para uma amostra do comprimido B em meio de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ encontra-se na Figura 4.24. A substância quando excitada no comprimento de onda de 225 nm apresenta emissão máxima em torno de 380 nm .

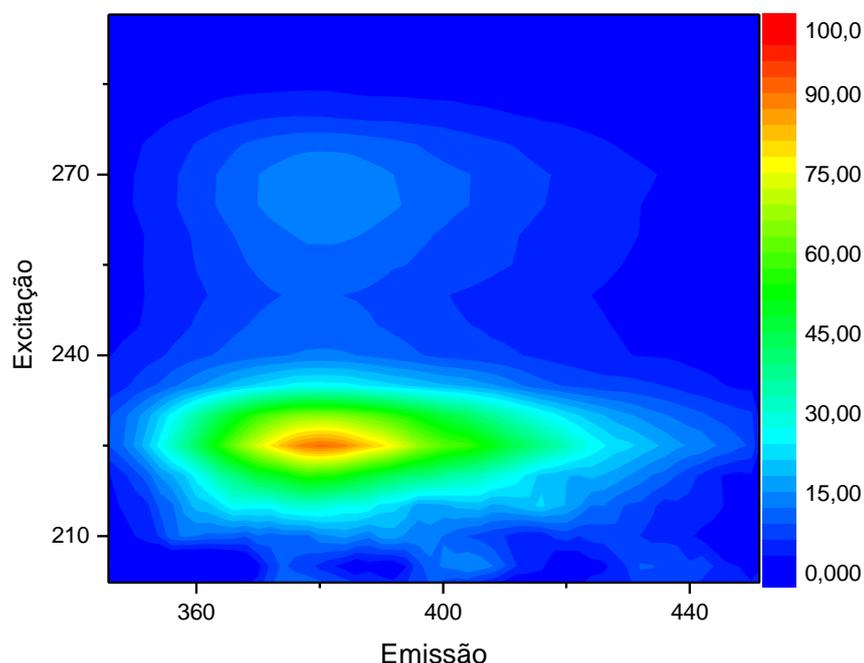


Figura 4.23 Espectro de emissão de cetoconazol para uma amostra do comprimido B em de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$).

O valor para o máximo de intensidade de emissão para a solução padrão de cetoconazol $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (em meio de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$) foi aproximadamente 96 u.a e o valor para o máximo de intensidade de emissão para uma amostra do comprimido B em meio de ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ foi 91 u.a, logo, a concentração da amostra do comprimido B utilizado no procedimento espectrofluorimétrico corresponde a $5,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, efetuando-se os cálculos para diluição da amostra, encontra-se um valor de concentração para amostra de comprimido B equivalente a $3,56 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \pm 7,12 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ (aproximadamente $189 \pm 0,4 \text{ mg}$ de cetoconazol por comprimido).

O valor teórico contido no rótulo da amostra do comprimido utilizado como amostra, descreve 200 mg de cetoconazol por comprimido, o valor experimental encontrado utilizando-se a técnica espectrofluorimétrica foi de 189 mg por comprimido.

Verifica-se que os valores encontrados são estatisticamente diferentes daqueles encontrados pelo procedimento comparativo. A baixa recuperação e a diferença estatística entre as sensibilidades da curva analítica e de adição de padrão nas amostras exigem maiores estudos para melhor avaliação dos dados.

Os valores para a determinação de cetoconazol estão apresentados na Tabela 4.12 a seguir:

Tabela 4.12 – Determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto (FIA-r) e o procedimento comparativo (espectrofluorimétrico)

| Amostra | Comparativo | FIA-r | Er %^a | Er %^b |
|----------------|--------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| | mg.g⁻¹ | | | |
| 200 | 189 ± 0,4 | 248 ± 4,96 | 19,3 | 23,8 |

^a Procedimento FIA proposto vs. Valor rotulado;

^b Procedimento FIA vs. procedimento comparativo.

5. CONCLUSÕES

Os parâmetros dos sistemas de análise por injeção em fluxo propostos, tanto para a determinação de peróxido de hidrogênio quanto para a determinação de cetoconazol, foram otimizados e com desvios padrões relativos dentro do limite aceitável.

Ambos os procedimentos de análise por injeção em fluxo desenvolvidos possuem procedimentos experimentais simples, os custos com reagentes e instrumentação são baixos, repetibilidade considerável e limite de detecção significativo quando comparados com outras referências bibliográficas.

Os procedimentos de análise por injeção em fluxo desenvolvidos atendem à alguns princípios da química verde, como a diminuição no consumo de reagentes e minimização de resíduos químicos.

Ambos os métodos possuem frequência analítica considerável (aproximadamente 60 determinações por hora) e não necessitam de tratamento de amostra (laborioso).

O procedimento desenvolvido para determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais de água oxigenada apresentou baixa recuperação e necessita-se de maiores estudos. Com relação à aplicação do procedimento desenvolvido para determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite, obteve-se precisão e exatidão, o que viabiliza a utilização do procedimento desenvolvido para a análise desta amostra.

O procedimento desenvolvido para determinação de cetoconazol apresentou baixa recuperação, mas quando comparou-se as sensibilidades da curva analítica e da curva de adição de padrão, as sensibilidades não foram diferentes. Neste caso, necessita-se de maiores estudos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. REIS, B.F. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, n. 1, v. 12, 1989.
- [2]. REIS, B.F. Análise Química por Injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, n. 1, v. 19, 1996.
- [3]. VIEIRA, H.J. **Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas**. São Carlos – SP, Programa de Pós-Graduação em Química – UfsCar. 2006. Tese de Doutorado, 129 p.
- [4]. ROCHA, F.R.P.; NÓBREGA, J.A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. **Green Chemistry**, v. 3, p.216–220, 2001.
- [5]. VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M.D., Flow-injection analysis: principles and applications. **Ellis Horwood series in analytical chemistry**. 1987, New York: John Willey & Sons.
- [6]. SILVA, A.S.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de glifosato em formulações comerciais de herbicidas. **Química Nova**, v. 35, n. 1, 2012.
- [7]. STAUB, I. **Avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol e determinação antifúngica e da segurança biológica in vivo e in vitro do xampu de cetoconazol**. Porto Alegre – RS, UFRGS. 2005. Tese Doutorado. 224 p.
- [8]. STAUB, I.; CRUZ, Á.S.; PINTO, T.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**, v. 43, p. 301-307, 2007.
- [9]. OLIVEIRA, P.R.; RESENDE, S.M.; OLIVEIRA, F.C.; OLIVEIRA, A.C.; Ceratite fúngica. **Sociedade Brasileira de Lente de contato e Córnea**, v. 9, p. 64-75, 2001.
- [10]. DUQUE, M.D.; SOUZA, D.H.; GONÇALVES, L.M.; BERNARDO, R.S.; PINHO, J.J.R.G. Avaliação das propriedades físico-químicas de preparações farmacêuticas contendo cetoconazol para uso tópico. **HU Revista**, n. 3 e 4, v. 39, 2013.
- [11]. MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R.F.P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, p. 188-197, 2009.

- [12]. FARHADI, K.; MALEKI, R. A new spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on the oxidation reactions. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 867., 2001.
- [13]. JALALI, F.; AFSHOON, A.; SHAMSUPIR, M. Micellar-enhanced spectrofluorimetric determination of ketoconazole in cetyltrimethylammonium bromide medium. **Chemia analityczna**, v. 1, p. 115-123, 2007.
- [14]. VOJIC, M.P.; POPOVIC, G.V.; SLADIC, D.M.; PFENDET, L.B. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 1, p. 67-78, 2005.
- [15]. SADEGHI, S.; SHAMSIPURS, M. A new extractive-spectrophotometric method for the determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**. v. 31, p. 2691-2705, 1998.
- [16]. RANE, S.S.; PADMAJA, P. Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 43-47, 2012.
- [17]. SCATOLIN, F.; TUBINO, M. Flow injection green method for the quantitative analysis of ketoconazole pharmaceutical preparations. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 624-628, 2010.
- [18]. MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: Importância e Determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
- [19]. YUAN, J.; SHILLER, A. M. The variation of hydrogen peroxide in rainwater over the South and Central Atlantic Ocean. **Atmospheric Environment**, v. 34, p. 3973-3980, 2000.
- [20]. GONÇALVES, C.; MATOS, R. C.; PEDROTTI, J. J. Avaliação preliminar de peróxido de hidrogênio em água de chuva na região central de São Paulo. In: **Anais XII Congresso Brasileiro de Meteorologia**, Foz de Iguaçu – PR, 2002.
- [21]. TANIAI, T.; SAKURAGAWA, A.; OKUTANI, T. Monitoring of Hydrogen Peroxide, Nitrate and Nitrite in Rain Water. **Analytical Sciences**, v. 16, p. 275-281, 2000.
- [22]. LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. Determination of Glucose Concentration by Electroluminescence of an Indium-Tin Oxide Electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 76, p. 327-253, 1996.
- [23]. OLIVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.F.P.; NETO, J. A. G. Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto-fenton. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 188-190, 2001.

- [24]. HUANG, Y. P.; CAI, R. X.; MAO, L. Y.; LIU, Z. H.; HUANG, H. P. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide Using β -CD-Hemin as a Mimetic Enzyme of Peroxidase. **Analytical Sciences**, v. 15, p. 889-894, 1999.
- [25] da SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. de O.; MUNOZ, R. A. A.; RITCHER E. M. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de azul da Prússia. **Química Nova (impresso)**, v. 34, p. 987-991, 2011.
- [26] ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- [27] FOSCHIERA, J. L. **Indústria de laticínios: Industrialização do leite, análises, produção de derivados**. Porto Alegre: Suliani Editografia Ltda, 2004.
- [28] TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3ª ed. Santa Maria: UFSM, 2008.
- [29] EMBRAPA. **Agronegócio do leite**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 26 mar. 2016.
- [30] TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 2003.
- [31] MANCILHA, I. M. **O leite de caixinha e a saúde pública**. Disponível em: <<http://www.usp.br/jorusp/arquivo/2007/jusp816/pag02.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2016.
- [32] MONTES, R. H. de O.; da SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RITCHER E. M. Determinação de peróxido de hidrogênio em leite empregando “batch injection analysis” (BIA) e eletrodo modificado. In: **34ª Reunião da SBQ**, Florianópolis – SC 2011.
- [33]. REIS, B.F.; BERGAMIM-FILHO, H. A evolução dos injetores empregados nos sistemas em fluxos. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 570-573, 1993.
- [34]. SOUZA, G. C.S.; SILVA, P. A. B.; LEOTÉRIO, D. M. S.; PAIM, A. P. S. A. multicommutated flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples. **Food Control**, v. 46, p. 127-135, 2014.
- [35]. FRAIHAT, S. M. A sequential injection system for spectrophotometric determination of ketoconazol, **Maejo Int. J. Sci. Technol**, v. 8, p. 232-239, 2014.

[36]. FRAIHAT, S. M.; BAHGAT, K. M. Spectrophotometric Methods for the Determination of Ketoconazole in Pharmaceutical Dosage Forms. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 1511-1514, 2014.