

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ANALITOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE
AMBIENTAL, ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICO UTILIZANDO
ESPECTROFOTOMETRIA DERIVATIVA E ESPECTROFLUORIMETRIA**

Ariane Maciel Neiva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal da Grande Dourados para a
obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

Dourados-MS

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N417d Neiva, Ariane Maciel.
Desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de analitos em amostras de interesse ambiental, alimentício e farmacêutico utilizando espectrofotometria derivativa e espectrofluorimetria. / Ariane Maciel Neiva. – Dourados, MS: UFGD, 2015.
83p.

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

1. Espectrofotometria derivativa. 2. espectrofluorimetria.
3. Amostras alimentícias. 4. Soluções farmacêuticas. 5. Águas de superfície I. Título.

CDD-615.14

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

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



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Desenvolvimento de Procedimentos Analíticos para Determinação de Analitos em Amostras de Interesse Alimentício e Ambiental Utilizando Espectrofotometria Derivativa e Espectrofluorimetria”, de autoria de Ariane Maciel Neiva, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

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

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

Prof. Dr. Willian Toito Suarez
Membro Examinador (UFV)

Dourados/MS, 27 de fevereiro de 2015

Dedico este trabalho a meus pais, Genésio e Marli, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

Aos meus amigos Paulo Ricardo e André Kuhn que sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira, pela orientação, incentivo, paciência e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química, em especial a Professora Daniele Mignolo dos Santos pela confiança, incentivo e amizade.

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

Ao Herbert Lee pela amizade, incentivo, ajuda e contribuição neste trabalho.

Ao prof Dr. Anderson Caires pela contribuição e ao Grupo de Óptica Aplicada da UFGD pelo apoio.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Lista de abreviaturas e siglas

AG: Ácido Gálico
FIA-UV: Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Ultravioleta
DTA: Análise Térmica Diferencial
BHA: Butilhidroxianisol
BHT: Butilhidroxitolueno
TBHQ: Butilhidroquinona
BFA: Bisfenol A
BFF: Bisfenol F
CG: Cromatografia Gasosa
CG/MS: Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro De Massa
CG-FID: Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama
CTZ: Cetoconazol
CLAE-UV: Cromatografia Líquida com Detecção Ultravioleta
DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial
LC-ESI-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Fonte De Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria De Massa
 β -CD: β -ciclodextrina
HPLC-FL: Cromatografia Líquida De Alta Eficiência com detecção por Fluorescência
LC-ESI-MS: Cromatografia Líquida acoplada a Fonte De Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria De Massa;
DPR: Desvio Padrão Relativo
ETE: Estação De Tratamento De Esgoto
CZE: Eletroforese Capilar De Zona
ESI: Usando Electrospray
GP: Galato De Propila
API: Ionização À Pressão Atmosférica
LD: Limites De Detecção
LS: Mínimos Quadrados Clássicos
PLS: Mínimos Quadrados Parciais
DLLME: microextração Líquido-Líquido Dispersiva
NP: Nonilfenol
OP: Octilfenol
POE: Poluentes Orgânicos Emergentes
RNA: Rede Neural Artificial
PCR: Regressão Por Componentes Principais
TG: Termogravimetria
 λ_{\max} : Comprimento De Onda Máximo
 λ_{ex} : Comprimento De Onda De Excitação
 λ_{em} : Comprimento De Onda De Emissão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos para determinação de BHA e BHT.....	8
Tabela 2- Procedimentos analíticos para determinação de Cetoconazol.....	19
Tabela 3- Procedimentos analíticos para determinação de Bisfenol A em água de rio.	26
Tabela 4- Equações das curvas analíticas de ordem zero obtidas para os antioxidantes em metanol e em duas marcas diferentes de etanol.	37
Tabela 5- Equações das curvas analíticas da primeira derivada para a mistura dos antioxidantes BHA e BHT em duas marcas de etanol.	38
Tabela 6- Análise de variância da curva analítica para o BHA utilizando-se a espectrofotometria derivativa de primeira ordem.....	42
Tabela 7- Análise de variância da curva analítica para o BHT utilizando-se a espectrofotometria derivativa de primeira ordem.....	42
Tabela 8- Comparação dos parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação dos antioxidantes utilizando-se a espectrofotometria de ordem zero e derivativa de primeira ordem.	43
Tabela 9- Resultados dos ensaios de recuperação da determinação de BHA, utilizando a primeira derivada.....	45
Tabela 10- Resultados dos ensaios de recuperação da determinação de BHT, utilizando a primeira derivada.....	45
Tabela 11- Análise de variância da curva analítica para determinação de Cetoconazol; (módulo alto).	51
Tabela 12- Equações das curvas analíticas para determinação do Cetoconazol em diferentes dias; (módulo alto).	52
Tabela 13- Ensaios de recuperação para a determinação de Cetoconazol em amostras de rio; (módulo alto).....	54
Tabela 14- Estudo de recuperação para avaliar a interferência dos produtos de degradação na determinação de CTZ. (módulo baixo).....	59
Tabela 15- Análise de variância da curva analítica para determinação de Cetoconazol. (módulo baixo).	63
Tabela 16- Equações das curvas analíticas para determinação do Cetoconazol em diferentes dias; (módulo baixo).	63
Tabela 17- Recuperação de cetoconazol em amostras de água de rio; (módulo baixo).	64
Tabela 18- Recuperação de cetoconazol em comprimidos; (módulo baixo).....	65
Tabela 19- Análise de variância da curva analítica para determinação de Bisfenol A.	72

Tabela 20- Equações das curvas analíticas para determinação de Bisfenol A em duas marcas diferentes de etanol.	73
Tabela 21- Ensaio de recuperação para a determinação de Bisfenol A em amostras de água de rio em etanol B (CRQ).....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura fenólica dos antioxidantes BHA e BHT.....	5
Figura 2- Estrutura química do Cetoconazol.	14
Figura 3- Distribuição das espécies do cetoconazol em função do pH.....	15
Figura 4- Estrutura química do Bisfenol A.....	21
Figura 5- Espectros de absorção obtidos em etanol de ordem zero do BHA $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e do BHT $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	34
Figura 6- Espectros de absorção da primeira derivada de uma solução contendo a mistura dos antioxidantes BHA $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e BHT $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	35
Figura 7- Espectros da derivada primeira do BHA (a) e do BHT (b) obtidos separadamente em etanol.....	36
Figura 8- Espectro de absorção de ordem zero para a curva analítica do BHA em etanol. (a) branco, (b) $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $1,11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $1,66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $2,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $2,77 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	39
Figura 9- Espectro de absorção de ordem zero para a curva analítica do BHT em etanol. (a)branco, (b) $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $1,81 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $3,63 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $4,54 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	39
Figura 10- Espectro de absorção de ordem zero (a) e da primeira derivada (b) para a curva analítica da mistura de antioxidantes BHA e BHT em etanol.....	40
Figura 11- Curva analítica da primeira derivada para a determinação de BHA em meio de etanol.....	41
Figura 12- Curva analítica da primeira derivada para a determinação de BHT em meio de etanol.....	41
Figura 13- Espectros da primeira derivada para os ensaios de recuperação de uma amostra de maionese.....	44
Figura 14- Espectro de (a) excitação e (b) emissão do Cetoconazol $7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 9,00. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.....	46
Figura 15- Espectro de emissão de Cetoconazol $7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.....	47
Figura 16- Influência do pH na intensidade de emissão do Cetoconazol $7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.....	48
Figura 17- Espectro de emissão de Cetoconazol $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 9,00 e do branco (solução tampão pH 9,00). ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.....	48
Figura 18- Espectro de emissão das soluções da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto. (a) $1,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$;	

(b) $5,00 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ; (c) $1,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (d) $2,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (e) $4,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (f) $6,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (g) $8,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (h) $9,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	50
Figura 19- Curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. (λ_{ex} = 237 nm; λ_{em} = 383 nm); módulo alto.....	50
Figura 20- Gráfico de resíduo dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. (λ_{ex} = 237 nm; λ_{em} = 383 nm) ; módulo alto....	51
Figura 21- Espectro de emissão dos produtos de degradação do Cetoconazol $1,00 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em HCl $0,10$ mol L ⁻¹ . (λ_{ex} = 237 nm); módulo alto.....	55
Figura 22- Espectro de absorção dos produtos de degradação do Cetoconazol $5,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em HCl $0,10$ mol L ⁻¹	56
Figura 23- Matriz de excitação e emissão de Cetoconazol $1,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).....	57
Figura 24- Matriz de excitação e emissão do produto de degradação do Cetoconazol por hidrólise ácida; concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).....	57
Figura 25- Matriz de excitação e emissão do produto de oxidação do Cetoconazol por adição de H ₂ O ₂ , concentração de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).	58
Figura 26- Espectro de absorção da solução de Cetoconazol padrão e Cetoconazol exposto a radiação UV; Concentração de $5,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , em HCl $0,10$ mol L ⁻¹	60
Figura 27- Matriz de excitação e emissão de Cetoconazol $1,00 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ exposto a radiação UV em HCl $0,10$ mol L ⁻¹ ; (módulo alto).....	60
Figura 28- Espectro de emissão da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. (λ_{ex} = 237 nm; λ_{em} = 383 nm); módulo baixo. (a) $1,00 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ; (b) $5,00 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ; (c) $1,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (d) $2,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (e) $4,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (f) $6,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (g) $8,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (h) $1,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	61
Figura 29- Curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. (λ_{ex} = 237 nm; λ_{em} = 383 nm); módulo baixo.	62
Figura 30- Gráfico de resíduos dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de CTZ em pH 9,00. (λ_{ex} = 237 nm; λ_{em} = 383 nm); módulo baixo.	62
Figura 31- Matriz de excitação e emissão de Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em etanol.....	67
Figura 32- Espectro de (A) excitação e (B) emissão do Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em etanol. (λ_{ex} = 276 nm; λ_{em} = 306 nm).	67
Figura 33- Espectro de emissão do Bifenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em diferentes solventes.....	68
Figura 34- Bifenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em metanol, acetonitrila, etanol A (Vetec) e etanol B (CRQ).	69

Figura 35- Espectro de emissão do Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em etanol e do branco (etanol). ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm).	70
Figura 36- Espectro de emissão da curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm). (a)branco; (b) $1,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (c) $3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (d) $5,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (e) $7,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (f) $9,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; (g) $1,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	71
Figura 37- Curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm).	71
Figura 38- Gráfico de resíduo dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm).	72

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANALITOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL, ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA DERIVATIVA E ESPECTROFLUORIMETRIA. Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de três procedimentos analíticos: O primeiro procedimento emprega a espectroscopia derivativa de primeira ordem para a determinação simultânea de BHA-BHT sem a necessidade de separação prévia, utilizando a técnica *zero crossing* em amostras de maionese e molho de salada. Os procedimentos apresentaram faixa linear variando entre $5,55 \times 10^{-5}$ a $3,33 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para quantificação de BHA e $9,08 \times 10^{-5}$ a $5,44 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para quantificação de BHT. O limite de detecção e quantificação calculados para o procedimento proposto foram de $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $6,67 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente para BHA, $4,77 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,44 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ respectivamente para BHT. O segundo procedimento emprega a espectrofluorimetria para determinação de Cetoconazol em duas matrizes (amostras de água de rio e comprimidos). A curva analítica apresentou uma linearidade entre $5,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,36 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. As recuperações que variaram de 75,2 a 98,5% para as amostras farmacêuticas e 75,6 a 108% para amostras de água de rio. O terceiro procedimento apresenta o emprego da espectrofluorimetria para determinação de bisfenol-A em amostras de água de rio. A curva analítica apresentou uma linearidade entre $7,50 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $7,37 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com recuperações que variaram de 70,5 a 106% para as amostras de água de rio.

Palavras chaves: espectrofluorimetria, espectrofotometria derivativa, bisfenol-A, validação, BHA

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR DETERMINATION of analytes in SAMPLE ENVIRONMENTAL, FOOD AND PHARMACEUTICAL INTEREST USING SPECTROPHOTOMETRY DERIVATIVE AND SPECTROFLUORIMETRY. In this working is shown the development of three analytical procedures: The first procedure was based on the first-order derivative spectroscopy for the simultaneous determination of BHA, BHT without previous separation, using the zero-crossing technique in mayonnaise and salad dressing samples. The procedure showed a linear range varying between 5.55×10^{-5} to 3.33×10^{-4} mol L⁻¹ for quantification of BHA. The linear range for BHT determination varying between 9.08×10^{-5} to 5.44×10^{-4} mol L⁻¹. The detection limit and quantification limit obtained for the proposed procedure were 2.53×10^{-5} mol L⁻¹ and 6.67×10^{-5} moles L⁻¹, respectively for BHA, and 4.77×10^{-5} mol L⁻¹ and 1.44×10^{-4} mol L⁻¹, respectively for BHT. The second developed procedure employs spectrofluorimetry for determination of ketoconazole in different matrices (river water samples and tablets). The calibration curve showed linearity between 5.00×10^{-7} to 1.00×10^{-5} mol L⁻¹, and a detection limit of 1.36×10^{-7} mol L⁻¹. The recoveries ranging from 75.2 to 98.5% for drug samples and from 75.6 to 108% for river water samples were obtained. The third spectrofluorimetric procedure developed was based on the fluorescence of bisphenol-A. The procedure was developed to determine BFA in river water samples. The calibration curve obtained was linear between 7.50×10^{-7} to 1.00×10^{-5} mol L⁻¹. the detection limit of 7.37×10^{-7} mol L⁻¹ and recoveries ranging from 70.5 to 106% for river water samples were obtained.

Keywords: spectrofluorimetry, derivative spectrophotometry, bisphenol-A, validation, BHA.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Espectroscopia de absorção.....	1
1.2	Espectroscopia de emissão	3
1.3	Aspectos gerais dos antioxidantes BHA e BHT	4
1.3.1	Métodos de determinação de BHA e BHT	7
1.4	Impacto ambiental de fármacos	12
1.4.1	Cetoconazol.....	13
1.4.2	Métodos de determinação de Cetoconazol.....	15
1.5	Impacto ambiental de desreguladores endócrinos	20
1.5.1	Bisfenol A	21
1.5.2	Métodos de determinação de Bisfenol A.....	22
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivos Gerais	27
2.2	Objetivos Específicos	27
2.2.1	Butil hidroxianisol e Butil hidroxitolueno	27
2.2.2	Cetoconazol.....	27
2.2.3	Bisfenol A	28
3	PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1	Instrumentação.....	28
3.2	Espectrofotometria derivativa para determinação de BHA e BHT em amostras alimentícias.....	28
3.2.1	Reagentes e soluções	28
3.2.2	Amostras de maionese e molho de salada	29
3.2.3	Preparo das amostras	29
3.2.4	Medidas espectrofotométricas	29
3.3	Desenvolvimento de procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de cetoconazol em águas de superfície e formulações farmacêuticas.....	30
3.3.1	Reagentes e soluções	30
3.3.2	Amostras farmacêuticas e de água de rio.....	30
3.3.3	Água de rio	31
3.3.4	Preparação do produto de degradação ácida e de oxidação do Cetoconazol.....	31
3.4	Desenvolvimento de procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de bisfenol A em águas de superfície	32
3.4.1	Reagentes e soluções	32
3.4.2	Amostras de água de rio.....	32
3.4.3	Efeito do solvente sobre a intensidade de emissão do Bisfenol A.....	33

3.4.4	Procedimento para determinação dos analitos por espectrofluorimetria	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1	Espectrofotometria derivativa para determinação de BHA e BHT em amostras alimentícias.....	33
4.1.1	Efeito do solvente sobre o espectro de absorção	36
4.1.2	Parâmetros de confiabilidade analítica	38
4.1.3	Estudo de recuperação de BHA e BHT em amostras de maionese e molho de salada	43
4.2	Espectrofluorimetria para determinação de Cetoconazol em água de rio e formulações farmacêuticas	46
4.2.1	Espectros de excitação e emissão.....	46
4.2.2	Efeito do pH do meio sobre a intensidade de emissão	47
4.2.3	Parâmetros analíticos de espectrofluorimetria para a determinação de Cetoconazol utilizando o “módulo alto” do equipamento.....	49
4.2.4	Teste de adição e recuperação do Cetoconazol em água de rio.....	52
4.2.5	Efeito dos interferentes produzidos pela hidrólise ácida e oxidação sob a intensidade de emissão do Cetoconazol.....	54
4.2.6	Fotodegradação do Cetoconazol com radiação UV	59
4.2.7	Parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação de Cetoconazol.....	61
4.2.8	Avaliação da recuperação do Cetoconazol em formulações farmacêuticas e água de rio	64
4.3	Espectrofluorimetria para determinação de Bisfenol A em água de rio	66
4.3.1	Espectros de excitação e emissão.....	66
4.3.2	Efeito do solvente sobre a intensidade fluorescência do Bisfenol A.....	68
4.3.3	Parâmetros analíticos de espectrofluorimetria para a determinação de Bisfenol A	70
4.3.4	Avaliação da recuperação do Bisfenol A em água de rio	73
5	CONCLUSÕES	76
6	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos, confiáveis, de baixo custo, simples e rápidos, contribui para o avanço da Química Analítica que enfrenta desafios constantes nas análises de espécies químicas, com o surgimento de matrizes cada vez mais complexas. Isso se deve em parte, à demanda industrial que desenvolve novos produtos e substâncias a todo o momento, os quais precisam de controle de qualidade rigoroso.

A análise de amostras ambientais tem se mostrado um desafio, com matrizes extremamente complexas, requerendo métodos analíticos aptos para a detecção dos analitos. As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a análise de uma infinidade de amostras, porém por se mostrar de elevado custo, dispendiosa e demorada, as técnicas alternativas tem chamado a atenção e se destacado com suas inúmeras vantagens, principalmente rapidez, versatilidade e simplicidade.

As técnicas espectrofotométricas, por exemplo, são largamente utilizadas para determinação de inúmeras espécies moleculares. A técnica é basicamente dividida em espectroscopia de absorção e emissão (fotoluminescência).

Na espectroscopia de absorção, mede-se a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda. Isso pode fornecer tanto informações qualitativas como quantitativas sobre a amostra. Na espectroscopia de fotoluminescência, a emissão de fótons é medida após a absorção. As formas mais importantes de fotoluminescência para os propósitos analíticos são as espectroscopias de fluorescência e fosforescência[1].

1.1 Espectroscopia de absorção

A espectroscopia ultravioleta visível (ordem zero) apresenta um conjunto de características que favorece o seu uso em rotinas de análises químicas. Dentre outras, é possível destacar a sua simplicidade operacional, elevada velocidade analítica, baixo custo e possibilidade de uso em sistemas de controle *on-line*. Infelizmente, os frequentes problemas de interferência espectral observados, representam sérias limitações na sua aplicabilidade[2].

A associação de duas ou mais substâncias é bastante frequente, neste caso a quantificação de uma espécie, na presença das demais, pode dificultar a análise por causa da interferência dos espectros, obrigando o uso de procedimentos de separação e/ou à utilização de técnicas cromatográficas.

Objetivando minimizar os efeitos de interferência, métodos derivativos têm sido propostos, normalmente envolvendo a primeira ou segunda derivada dos sinais espectroscópicos. Com a derivatização dos espectros os sinais sobrepostos são separados, o que minimiza a interferência e viabiliza determinações sem necessidade de procedimentos de separação prévia[2].

A diferenciação do espectro de ordem zero não aumenta as informações do espectro original, mas ocorre supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas, a resolução de um “ombro” para uma banda, etc., obedecendo, ainda, a Lei de Beer-Lambert[3]. A espectrofotometria derivativa é atualmente uma ferramenta analítica adicional que auxilia na resolução de diversos problemas analíticos. A derivatização dos espectros permite separar sinais sobrepostos e eliminar “background” causado pela presença de outras espécies na amostra[4].

Em um espectro de primeira ordem (derivada primeira) ocorre a anulação no ponto referente ao comprimento de onda máximo (λ_{\max}) do espectro de ordem zero[3]. É positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela diminui. Assim, uma curva diferencial de ordem n se anula n vezes, apresentando $n + 1$ bandas[3].

Na sobreposição de espectros de derivadas dos componentes de uma mistura, obtidos desse modo, podem-se individualizar melhor os constituintes e até eliminar a interferência de um componente sobre o outro[3]. O que permite examinar informações instrumentais que não são visualizadas normalmente em um espectro de ordem zero, mas que são extremamente importantes para a análise de misturas de substâncias, que precisam ser detectadas ou quantificadas, mesmo em casos de sobreposição espectral.

A espectroscopia derivativa apresenta maior sensibilidade e maior seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional. O aumento da seletividade deve-se a separação das bandas sobrepostas, enquanto que o aumento da sensibilidade é devido à amplificação do sinal da derivada e a diminuição do ruído[5].

Muitas das inovações referentes à espectrofotometria consistem em estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica e permitindo, em alguns casos, que medidas em concentrações da ordem de nmol L^{-1} sejam efetuadas[6].

Diversas técnicas ou métodos de derivadas são encontrados na literatura: zero pico, ponto de anulação, derivada da razão do espectro, calibração multivariada, dentre outras[5]. A técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* mede o valor absoluto da amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda do ponto de anulação do outro componente, diminuindo o erro sistemático quando comparado à determinação gráfica[5].

1.2 Espectroscopia de emissão

A luminescência é a emissão de luz a partir de qualquer estado excitado de uma molécula[7]. Envolve vários tipos de fenômenos ópticos; os mais difundidos referem-se à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência[1, 8]. Contudo, cabe ressaltar que ainda existem a sonoluminescência, a mecano- ou triboluminescência, a radioluminescência, a termoluminescência, a bioluminescência, entre outros[8].

Estas técnicas estão fundamentadas nos fenômenos que ocorrem quando uma molécula, após sofrer excitação, retorna ao seu estado fundamental, produzindo um espectro de emissão característico. Análises qualitativa ou quantitativa podem ser realizadas com as intensidades de emissão presentes nestes espectros[9].

Ambas as técnicas de fluorimetria e fosforimetria baseiam-se na absorção de um fóton pelo grupo fluoróforo para promover uma molécula a um estado excitado, diferenciando-se entre si apenas quanto à natureza das transições eletrônicas, onde no caso da fluorescência, estas transições ocorrem sem envolver a alteração de spins dos elétrons. Quando o estado excitado não é obtido pela absorção de um fóton, mas no decorrer de uma reação química, gerando luminescência na desativação deste estado, então este processo caracteriza-se como um processo de quimiluminescência [9].

Os métodos fotoluminescentes apresentam muitas vantagens, como ampla faixa linear de resposta, elevada sensibilidade e seletividade o que possibilita a análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial. A estas características devem ser adicionadas a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos[8].

As medidas de luminescência são frequentemente combinadas com técnicas de separação, como cromatografia e eletroforese. Os detectores de fluorescência são particularmente adequados como detectores para cromatografia líquida e eletroforese capilar[1].

A fluorimetria é a técnica luminescente mais utilizada para fins analíticos. A utilização desta técnica na análise de fluidos naturalmente fluorescentes (fluorescência intrínseca) possui a vantagem adicional de dispensar a preparação da amostra com adição de aditivos fluorescentes[10].

Os componentes dos instrumentos para medir a fotoluminescência (fluorescência e fosforescência) são similares àqueles encontrados nos fotômetros ou espectrofotômetros ultravioleta-visível. Quase todos os instrumentos de fluorescência empregam ótica de duplo feixe. O feixe superior da amostra passa inicialmente através do seletor de excitação de comprimento de onda (filtro ou monocromador), o qual transmite a radiação que excita a fluorescência, mas exclui ou limita a radiação do comprimento de onda de emissão

fluorescente. A fluorescência é emitida pela amostra em todas as direções, mas é convenientemente observada em ângulos retos ao feixe de excitação. A geometria do ângulo reto minimiza as contribuições do espalhamento e da radiação intensa da fonte. A radiação emitida passa então através de um seletor de emissão de comprimento de onda (filtro ou monocromador) que isola a emissão da fluorescência. A radiação isolada atinge, então, um fototransdutor, onde é convertido em um sinal elétrico para a medida[1].

Um espectrofluorímetro fornece após as análises, espectros de excitação e emissão, que permitem determinar o analito de interesse.

Um espectro de excitação é medido variando-se o comprimento de onda de excitação e medindo-se a luz emitida num determinado comprimento de onda (λ_{em}). Um espectro de excitação é um gráfico da intensidade de emissão contra o comprimento de onda de excitação. Um espectro de excitação se parece muito com um espectro de absorção, pois quanto maior a absorvância no comprimento de onda de excitação, mais moléculas são promovidas para o estado excitado e mais emissão será observada[7].

1.3 Aspectos gerais dos antioxidantes BHA e BHT

A deterioração do alimento com o tempo, em razão de sua natureza biológica, é inevitável. Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo microrganismos e processos químicos[11].

A complexidade do processamento do alimento, associada à necessidade de aumentar o período de armazenamento, torna o produto vulnerável à deterioração oxidativa. Portanto, a utilização de substâncias químicas capazes de oferecer proteção contra a oxidação é necessária[11].

A maioria dos alimentos que faz parte da dieta humana possui certa quantidade de lipídios[11]. Em termos alimentares, a deterioração de óleos e gorduras é responsável pelos odores e sabores rançosos, com conseqüente decréscimo da qualidade e segurança nutricionais, causado pela formação de produtos secundários, potencialmente tóxicos[12].

Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas da redução da validade dos produtos alimentícios industrializados bem como das matérias-primas em geral. Portanto, o conhecimento e compreensão dos mecanismos de reação e as formas de controle para os mesmos são de suma importância econômica para a indústria alimentícia[13].

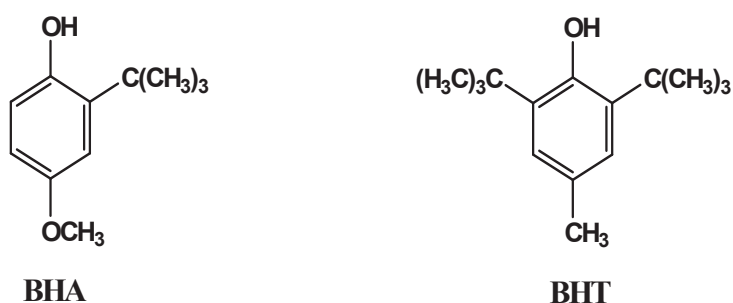
Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes[14]. Sabendo-se que a oxidação de lipídios é uma reação que não pode ser

totalmente cessada e que, uma vez iniciada, ocorre em alta velocidade, o seu início pode ser retardado pela adição de antioxidantes[15], que podem ser naturais ou sintéticos.

Os antioxidantes sintéticos são substâncias que tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária; sendo assim, estão sujeitas a legislações específicas de cada país ou por normas internacionais[16]. Em alimentos, os antioxidantes fenólicos sintéticos de uso permitido restringem-se a quatro tipos: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), butil hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP)[11].

Os antioxidantes sintéticos BHA e BHT são um dos mais utilizados na indústria alimentícia, apresentam uma estrutura fenólica (Figura 1) e podem ser utilizados individualmente ou sinergicamente. São adicionados em diversos produtos, como óleos, gorduras, alimentos contendo gorduras, e em embalagens[11].

Figura 1- Estrutura fenólica dos antioxidantes BHA e BHT.



BHA e BHT com base em suas funções são classificados como antioxidantes primários. Atuam bloqueando a ação de radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo antioxidante-lipídio[11].

O BHA é um antioxidante mais efetivo no retardamento da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, a sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade em temperaturas elevadas, mas é efetivo no controle de oxidação de ácidos de cadeia curta, como por exemplo, os que estão contidos em óleo de coco e de palma[17]. O antioxidante BHT tem propriedades similares ao BHA, porém, enquanto o BHA é um sinergista para galatos de propila, o BHT não[17]. O BHA e o BHT são sinergistas entre si. O BHA age como sequestrador de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA[17].

São aditivos frequentemente utilizados, isoladamente ou em misturas, para evitar o ranço oxidativo em alimentos. O uso de misturas binárias de antioxidantes é muito comum uma vez que aumentam o poder antioxidante devido à sinergia, a mistura de BHT-BHA é

comum em alimentos gordurosos[18]. Como é difícil encontrar um antioxidante que reúna todas estas características é comum recorrer-se a sinergismos. É habitual a combinação de dois ou mais aditivos de modo a conseguir reunir os benefícios de cada composto adicionado[17].

No Brasil, quase não existem dados sobre os níveis reais de antioxidantes presentes nos alimentos. Portanto, é de fundamental importância desenvolver um método analítico que seja adequado para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos permitidos pela legislação brasileira. Recomenda-se que o método seja simples, reprodutível e rápido, permitindo que órgãos oficiais fiscalizem e garantam que os alimentos estejam dentro de padrões de qualidade aceitáveis para consumo[16].

Esses antioxidantes têm sido monitorados com intenso rigor para evitar a sua utilização em excesso e indevida nos alimentos. Através de procedimentos analíticos é possível determinar a concentração dos antioxidantes presentes em diferentes alimentos e estimar a ingestão potencial destes aditivos pela população, de forma a garantir o emprego seguro destes aditivos[19].

A principal preocupação quanto ao uso de antioxidantes está relacionada aos possíveis efeitos toxicológicos associados a estes compostos. Em vista disto, a determinação analítica dos níveis de antioxidantes em alimentos é essencial para certificar que as quantidades efetivamente presentes nos alimentos no momento do consumo não excedam os limites permitidos pela legislação e, ao mesmo tempo, verificar se tais quantidades são suficientes para manter a qualidade destes alimentos[20].

Assim, a determinação de antioxidantes fenólicos sintéticos em alimentos é necessária para assegurar o cumprimento dos requisitos legais, bem como procedimentos de controle de qualidade na indústria de alimentos[21].

Uma mistura de dois ou mais antioxidantes é normalmente encontrado em alimentos, já que em muitos casos, a eficácia da associação destes compostos (sinergismo) é maior do que o uso de apenas um tipo de antioxidante. Considerando que tais compostos são geralmente quimicamente semelhantes, a análise é dificultada sem a separação prévia dos componentes, por causa da interferência. Geralmente métodos cromatográficos são bastante utilizados para a análise desse tipo de mistura, e é necessário um preparo de amostra eficiente, além do uso de grandes quantidades de solvente orgânico.

Uma alternativa bastante viável nestes casos é a espectroscopia derivativa que possibilita determinar a concentração do analito na amostra sem pré-tratamentos trabalhosos e utilizando solventes menos tóxicos, o que proporciona baixo custo operacional, e rapidez.

1.3.1 Métodos de determinação de BHA e BHT

Para determinação de BHA e BHT diferentes métodos analíticos são descritos na literatura, os quais são apresentados abaixo e alguns estão resumidos na Tabela 1. Entre estes, destacam-se os espectroscópicos, voltamétricos, espectrofluorimétricos, a cromatografia gasosa (CG) e análise por injeção em fluxo com detecção ultravioleta (FIA-UV). Esses métodos são usados para determinação dos dois antioxidantes separadamente e/ou simultaneamente em amostras de maionese, margarina, gordura, manteiga, queijo, molho de salada, azeite de oliva, cosméticos, frutas, óleos vegetais, óleo minerais e óleos sintéticos.

Tabela 1- Métodos para determinação de BHA e BHT.

Técnica	Extração	Faixa Linear de resposta	Recuperação %	Amostra	Ref.
Voltametria Cíclica	Metanol	BHA: 0,10 a 1,50 g mL ⁻¹ BHT: 0,20 a 2,20 g mL ⁻¹	93,7-105 92,3-97,0	Óleos comestíveis	[22]
Voltametria de Onda Quadrada	Etanol	0,06 a 9,03 µg mL ⁻¹ ambos antioxidantes	96,2-102 ambos antioxidantes	Maionese	[23]
CG/MS	Acetonitrila	0,01 a 20,0 µg mL ⁻¹ ambos antioxidantes	BHA: 99,7-107 BHT: 95,6-104	Óleos vegetais	[24]
Voltametria de Onda Quadrada	Etanol	0,11 a 2,20 µg mL ⁻¹ ambos antioxidantes	BHA:101 BHT:99,0	Margarina e maionese	[21]
FIA-UV	Hexano	10,0 a 300 µg mL ⁻¹ ambos antioxidantes	101 – 105 ambos antioxidantes	Gordura	[18]
CG-FID	-	-	BHA: 101-104 BHT: 93,0-98,0	Óleos vegetais, margarina, manteiga, queijo, maionese e molho de salada	[25]
Voltametria de Varredura Linear	Etanol	-	-	Óleo mineral e sintético	[26]
Voltametria de Onda Quadrada	Acetonitrila	0,02 a 0,20 µg mL ⁻¹ ambos antioxidantes	88,0-118 ambos antioxidantes	Azeite de oliva	[27]
Espectrofluorimetria	Acetona e acetato de etila	BHA: 0,05 a 5,00 mg mL ⁻¹	-	Sopa desidratada e goma de mascar	[28]
Espectrofluorimetria	Metanol	BHA: 0,06 a 0,12 µg mL ⁻¹	BHA : 95,7-104	cosméticos	[29]
Espectrofotometria	Metanol	BHA: 0,60 a 16,0 µg mL ⁻¹ BHT: 1,00 a 26,0 µg mL ⁻¹	BHA: 92,3-117 BHT: 92,5-103	Óleos vegetais	[30]
Espectrofotometria	Solução etanol (50%)/água	-	BHA: 96,9-97,4	Óleo e gordura	[31]
Espectrofotometria	Solução etanol (50%)/água	-	BHA: 95,8-96,1	Óleo e gordura	[32]

CG/MS- Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa; CG-FID- Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama; FIA-UV- Análise por Injeção em Fluxo com Detector Ultravioleta.

- não informado pelo autor do trabalho.

Uma determinação simultânea de duas misturas binárias BHT/GP e BHT/BHA em amostras de alimentos e cosméticos foi proposta[18] utilizando análise por injeção em fluxo com detecção no ultravioleta (FIA-UV). A determinação de cada antioxidante foi baseada na medida da sua absorbância em comprimentos de onda máximos utilizando um detector de arranjo de diodos. A faixa de linearidade foi de 10,0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada antioxidante em ambas as misturas. Os desvio padrão relativo (DPR) foram de 2,50% para o BHT e 2,00% para o antioxidante coexistente. O método foi aplicado para a determinação de ambos os antioxidantes em alimentos ricos em gordura e amostras de cosméticos com recuperação, variando entre 101 e 105%.

Um método para determinação simultânea de BHA e BHT em amostras de margarina e maionese por voltametria de onda quadrada[21] foi desenvolvido utilizando um eletrodo pré-tratado de diamante dopado com boro. Os limites de detecção (LD) para a determinação simultânea de BHA e BHT foram 1,80 e 2,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As recuperações foram de 101% para BHA e 99,0% para o BHT. As curvas analíticas apresentaram linearidade na faixa de concentração 0,60 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tanto para o BHA quanto para o BHT.

O comportamento eletroquímico dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, por voltametria cíclica[22] foi estudado, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro. O método foi desenvolvido para a determinação simultânea de BHA, BHT e TBHQ em misturas, com o uso da primeira derivada. As faixas de concentração linear foram 0,10 a 1,50 g mL^{-1} ; 0,20 a 2,20 g mL^{-1} e 0,20 a 2,80 g mL^{-1} , os limites de detecção (LD) foram 0,039; 0,080 e 0,079 g mL^{-1} e as recuperações foram 93,7 a 105%, 92,3 a 97,0% e 91,6 a 102% para BHA, BHT e TBHQ, respectivamente. O método foi aplicado na análise dos três analitos em amostras de óleo comestível.

Um método eletroquímico[23] foi desenvolvido para a determinação individual e simultânea de BHA e BHT em amostras de alimentos, utilizando voltametria de onda quadrada. Um eletrodo compósito de carbono modificado com cobre (II) e fosfato imobilizado em uma resina de poliéster foi proposto. As curvas de calibração para a determinação simultânea de BHA e BHT mostraram uma resposta linear de $3,40 \times 10^{-7}$ a $4,10 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e as recuperações foram de 96,2 a 102% para ambos os compostos. Os limites de detecção para a determinação simultânea de BHA e BHT foram de $7,20 \times 10^{-8}$ e $9,30 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} , respectivamente.

Um procedimento para determinação de BHA, BHT e TBHQ em óleos vegetais por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS)[24] foi desenvolvido. As recuperações dos antioxidantes fenólicos para óleo de soja, óleo de amendoim e óleo de cereais foram de 95,6 a 104% para BHT; 99,7 a 107% para BHA e 93,6 a 104% para TBHQ

com o DPR inferiores a 3,00% para suas medidas independentes. A linearidade foi obtida no intervalo de concentração de 0,01 a 20,0 mg L⁻¹ para cada antioxidante, com o coeficiente de regressão de 0,9992 para BHT, 0,9998 para BHA, 0,9997 para TBHQ. O LD para o BHT foi de 0,001 mg L⁻¹, para BHA foi de 0,002 mg L⁻¹ e para o TBHQ 0,004 mg L⁻¹.

Um método analítico[25] foi desenvolvido para a quantificação direta dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em lipídios presentes em alimentos, por CG-FID com uma coluna capilar de sílica fundida. Com o presente método cerca de 30,0-60,0 mg de amostras comerciais foram analisadas, incluindo óleo de cozinha, óleo de peixe, manteiga, margarina, queijo, maionese e molho de salada. Para a análise de cada amostra foi necessário 18 minutos. As recuperações de antioxidantes para a mistura de óleos foram de 92,5 a 108%, os coeficientes de variação ficaram abaixo de 7,40%.

Um novo método[26] foi proposto para a determinação simultânea de BHA e BHT em óleos minerais e sintéticos, por voltametria de varredura linear utilizando um eletrodo de disco de ouro. Sobreposições parciais de ambos os sinais podem ser resolvidos por tratamento matemático especial dos voltamogramas correspondentes com o auxílio de um procedimento simples, proposto pelos autores. O método eletroanalítico desenvolvido permitiu a determinação de BHA e BHT em misturas.

Um método eletroanalítico[27] foi proposto, usando voltametria de onda quadrada com ultramicroeletrodo de Platina para realizar análises qualitativa e quantitativa de diferentes misturas de antioxidantes sintéticos em óleos alimentares. O método de adição de padrão foi utilizado para quantificar os antioxidantes sintéticos individualmente na amostra real. Porcentagens de recuperação ficaram entre 88,0 e 118%.

Um método[28] foi desenvolvido para a determinação do antioxidante BHA por espectrofluorimetria. A fluorescência pode ser medida diretamente sem extração prévia ou separação cromatográfica do composto. A faixa linear foi de 0,05 a 5,00 µg mL⁻¹, com um DPR de 3,80% e um LD de 52,0 ng mL⁻¹.

Uma nova metodologia[29] foi apresentada para a determinação simultânea de BHA e GP(galato de propila) utilizando espectrofluorimetria e o método de calibração de segunda ordem. Os limites de detecção foram 1,20 a 1,30 ng mL⁻¹ para o BHA e 2,20 a 2,90 ng mL⁻¹ para o GP. As recuperações a partir de amostras de cosméticos estão nas faixas de 95,7 a 104% para BHA e 95,9-106% para GP.

Misturas dos antioxidantes BHA, BHT e GP foram analisadas simultaneamente por espectrofotometria[30], com base em suas diferentes propriedades cinéticas. Estes antioxidantes reagem diferencialmente com Fe (III), e o produto reduzido a Fe (II) irá ser complexado com o reagente cromogênico. Os espectros diferenciados cineticamente foram registrados em 510 nm, e os dados obtidos a partir dos experimentos foram processados

por abordagens quimiométricas, tais como a rede neural artificial (RNA), mínimos quadrados clássicos (CLS), regressão por componentes principais (PCR) e mínimos quadrados parciais (PLS). Um conjunto de misturas sintéticas de antioxidantes foi avaliada e verificou-se que o método de RNA proporciona uma precisão melhor do que aqueles de CLS, PCR e PLS. O método proposto foi também aplicado de modo satisfatório para a determinação de antioxidantes em vários produtos alimentares comerciais.

Um método espectrofotométrico[31] foi desenvolvido para a determinação dos antioxidantes TBHQ, BHA e AG (ácido gálico), utilizando 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e sulfato de amônio cérico. MBTH é oxidado e os seus produtos de ressonância são acoplados com os antioxidantes para gerar espécies coloridas que obedecem a lei de Beer. O método foi sensível, reprodutível e preciso para a determinação de antioxidantes em óleos e gorduras.

Um método espectrofotométrico[32] foi desenvolvido para a determinação de alguns antioxidantes utilizando permanganato de potássio e metol (p-N-metilaminofenol). Metol é oxidado em um pH de 3,00 com permanganato de potássio juntamente com os antioxidantes. A leitura é realizada em 560 nm para o GP e AG e a 510 nm para o BHA. As amostras foram óleos e gorduras.

Um método utilizando cromatografia capilar para analisar simultaneamente aditivos alimentares[33] foi desenvolvido. A mistura aditiva era composta por GP, octil galato, dodecil galato, BHA, BHT, TBHQ, entre outros. Utilizou-se sistemas micelares mistos de agentes tensoativos para a separação destes aditivos. Solventes orgânicos foram adicionados às fases micelares mistas para otimizar a separação. A mistura foi separada com sucesso, utilizando um tampão de borato $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com uma mistura de tensoativos e 10,0% de metanol adicionado a pH 9,30. Aditivos para bebidas de cola e geléia de baixa caloria foram investigados e os antioxidantes foram quantificados utilizando este método.

Dois métodos são descritos[34], um de análise por injeção em fluxo e outro utilizando eletrodo de carbono vítreo, para a determinação dos antioxidantes BHA e BHT com base na sua oxidação. A linearidade da curva varia de 1,00 a 10,0; 0,10 a 1,00 e 0,01 a 0,10 mg L^{-1} para BHA e 1,00 a 8,00; 0,10 a 1,00 e 0,02 a 0,10 mg L^{-1} para BHT. Os limites de detecção para o BHA e BHT são 2,50 e 6,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A determinação de BHA na presença de BHT é possível porque o primeiro é mais facilmente oxidado do que o segundo. Bons resultados foram obtidos através da aplicação de métodos de injeção em fluxo para determinar BHA em óleo de milho e BHT em amostras de éter etílico estabilizados após reação dos analitos.

Um método espectrofotométrico[35] foi desenvolvido para determinação de antioxidantes utilizando lacase. O método inclui a oxidação simultânea do substrato lacase

produzindo o cátion radical cromóforo. Os dados cinéticos foram analisados usando um sistema de oxidação simultânea do antioxidante e do substrato. A faixa linear da curva analítica foi de $9,00 \times 10^{-7}$ a $7,30 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e as recuperações variaram de 82,0 a 124% em amostras de alimentos.

1.4 Impacto ambiental de fármacos

O crescimento demográfico e a expansão industrial trouxeram como consequência quadros de contaminação atmosférica, do solo e dos recursos hídricos em todo o mundo[36]. Produtos químicos são amplamente consumidos pela sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes, está na imensa quantidade de resíduos gerados, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente[37].

Uma classe de poluentes que tem chamado a atenção é a dos poluentes orgânicos emergentes (POE) que referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, etc., ou ainda qualquer micro-organismo, que pode ser encontrado em matrizes ambientais e biológicas, que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente[37].

A indústria farmacêutica cresce a cada ano e está presente no cotidiano da população mundial, conseqüentemente fármacos, tem sido detectados de forma crescente no meio ambiente[38]. A quantidade real de medicamentos consumidos é ainda maior, pois nesses dados não estão inclusos medicamentos consumidos sem receituário médico ou adquiridos ilegalmente[37].

Fármacos são POE detectados no meio ambiente em baixas concentrações, apesar disso, o tema gera grande preocupação, uma vez que são substâncias biologicamente ativas que podem desencadear efeitos ainda desconhecidos em organismos aquáticos, comprometer a qualidade dos recursos hídricos, alterando a biodiversidade e o equilíbrio de ecossistemas aquáticos[36].

Após prescrição na medicina humana ou veterinária os fármacos são absorvidos pelo organismo e sofrem reações metabólicas. Entretanto, uma quantidade significativa desses fármacos originais e seus metabólitos são excretados na urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico. Os resíduos seguem com o esgoto bruto para as estações de tratamento de esgoto (ETEs) onde são submetidos a

processos convencionais de tratamento de efluentes, que não são capazes de eliminar totalmente os resíduos[39, 40, 41]. Estes processos convencionais que são baseados na degradação biológica dos contaminantes, não são eficientes para a completa remoção de fármacos residuais por possuírem ação biocida ou estruturas químicas complexas não passíveis de biodegradação, como resultado, resíduos farmacêuticos podem ser observados nos efluentes das ETEs, águas superficiais e, menos frequentemente, nas águas subterrâneas e água potável[36, 37, 42, 43].

Fármacos residuais entram no ambiente principalmente pelo lançamento de esgotos domésticos, tratados ou não, em cursos de água. Todavia outras fontes de contaminação também são observadas, como os efluentes de indústrias farmacêuticas e a disposição incorreta de seus resíduos em aterros sanitários; efluentes rurais, a presença de fármacos no esterco animal utilizado como adubo e fertilizante de solos; lodo digestivo proveniente das ETEs reutilizados na agricultura contaminam as águas do subsolo; disposição inadequada de fármacos após expiração do prazo de validade[36, 38, 42].

É preciso uma avaliação criteriosa dos efeitos desses fármacos no meio aquático. Uma vez conhecido os efeitos, será necessário estabelecer os limites de concentrações para o descarte seguro de efluentes domésticos tratados em corpos receptores. O monitoramento da eficiência de remoção desses fármacos pelos processos convencionais de tratamento de efluentes domésticos das ETEs é de grande importância, pois no futuro, podem ser necessárias adaptações, ou mesmo implantar outros processos de tratamento que complementem a remoção adequada desses fármacos[42].

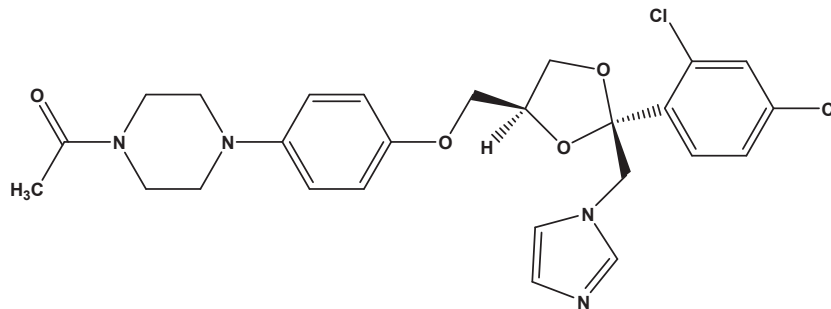
Inúmeros fármacos com fluorescência nativa são apresentados na literatura[8], dentre esses o Cetoconazol (CTZ), um antimicótico extensivamente utilizado pela população e por isso, resíduos deste medicamento podem ser encontrados facilmente no ambiente, em especial nos recursos hídricos.

1.4.1 Cetoconazol

O Cetoconazol (Figura 2) de nome químico (*cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, foi o primeiroazol a ser administrado oralmente para tratamento de infecções sistêmicas por fungos[44].

É um antifúngico e derivado imidazólico, amplamente utilizado no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas, infecções ginecológicas, pneumonia fúngica e na profilaxia de micoses em pacientes imunodeprimidos, infecções de pele e mucosa [44, 45, 46]. No Brasil apresenta-se nas formas de comprimidos, creme dermatológico e xampu[45].

Figura 2- Estrutura química do Cetoconazol.



O CTZ exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos sensíveis, que passam a perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo, por fim, o rompimento da membrana[46, 47, 48]. Esta atividade resulta da ação inibitória do CTZ (e dos demais derivados azólicos) sobre a enzima citocromo P-450, a qual é responsável pela síntese e degradação dos ácidos graxos e esteróides endógenos nas células animais, vegetais e seres unicelulares. Esta ação sobre a membrana é variável de acordo com o fungo e a dose do medicamento[46, 47, 48].

Quimicamente, O CTZ é uma base diprótica e sua forma molecular é ligeiramente hidrossolúvel. O conhecimento sobre a distribuição do equilíbrio e da solubilidade de CTZ dentro da faixa de pH fisiológico pode ajudar a compreender melhor os detalhes do mecanismo relacionado à sua ação como uma droga, ou seja, a absorção de medicamentos no trato gastrointestinal, bem como o seu transporte através de membranas da célula depende das propriedades das espécies químicas envolvidas[49].

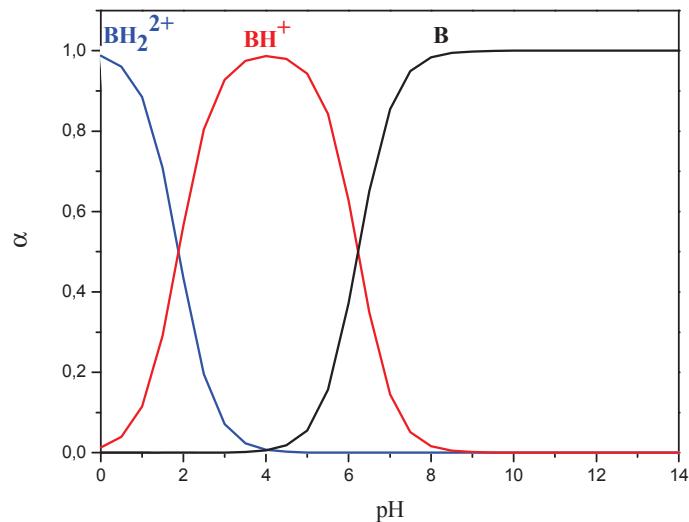
Em soluções aquosas, quase todos os fármacos são sujeitos a alguma forma de degradação química. A consequência mais comum da degradação da droga é a perda de eficiência e em alguns casos, produtos de degradação tóxicos podem ser formados. O CTZ é uma base fraca com dois $pK_a = 6,51$ e $2,94$. Pode sofrer degradação, incluindo a oxidação e a hidrólise, especialmente em meios aquosos, se não for adequadamente formulado. Ao investigar a estabilidade intrínseca da droga, é possível fornecer informações sobre as formulações para atingir a estabilidade desejável aos produtos[50].

As constantes de acidez (Figura 3) são definidas da seguinte forma[49]:

$$K_{a1} = \frac{[H_3O^+] \times [BH^+]}{[H_2B^{2+}]}$$

$$K_{a2} = \frac{[H_3O^+] \times [B]}{[BH^+]}$$

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



1.4.2 Métodos de determinação de Cetoconazol

Um procedimento empregando cromatografia líquida com detecção ultravioleta (CLAE-UV) foi desenvolvido[51] para a determinação de três antifúngicos, clotrimazol, cetoconazol e fluconazol em formulações farmacêuticas. As leituras dos medicamentos na forma de comprimidos e creme foram realizadas a 260 nm. Obteve-se para o CTZ a equação de curva analítica $y = 0,007x - 0,028$, com faixa linear de 80,0 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, coeficiente de regressão (r) 0,9999 e LD de $1,88 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. No ensaio de recuperação obteve-se uma média de 99,9% para as amostras de creme e comprimidos.

Procedimentos de eletroforese capilar de zona (CZE) e CLAE-UV foram desenvolvidos para a identificação e determinação de CTZ em preparações farmacêuticas[52]. As adequações de ambos os métodos para a determinação quantitativa do CTZ em comprimidos e cremes foram verificadas pela determinação dos parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Sob as condições descritas, o método de CZE foi mais seletivo, enquanto que o método de CLAE foi mais sensível. Ambos os métodos são rápidos (t_R (CZE) = 5,14 min e t_R (CLAE) = 2,66 min). CLAE apresentou desvio padrão relativo (DPR) inferior a 2,00%, enquanto a repetibilidade do CZE apresentou DPR na ordem de 2,00 a 3,00%. O comprimento de onda de detecção foi de 225 nm para ambos. Para o método de CZE obteve-se a equação de curva analítica $y = 3345682x - 4364$; $r = 0,9998$; recuperação de 95,9 a 104% com DPR de 2,95%;

Enquanto para o HPLC a equação de curva analítica foi $y=20922 \times C + 71$; $r = 0,9997$; recuperação de 98,2 a 101% com DPR de 1,91%.

Um procedimento foi desenvolvido[53] para a determinação eletroanalítica de CTZ em formulações farmacêuticas. Neste trabalho avaliou-se o comportamento eletroquímico do CTZ com o emprego de um eletrodo de prata. As condições experimentais e voltamétricas foram avaliadas e as melhores respostas foram obtidas em tampão pH 12,0 com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Sob estas condições, a resposta voltamétrica do CTZ apresentou um pico de redução bem definido e quase reversível em torno $-1,46 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl^- a $3,00 \text{ mol L}^{-1}$. As recuperações do eletrólito puro, bem como das amostras de comprimidos, shampoos e cremes, apresentou valores entre 90,8 e 105% (média de 90,8% para comprimidos, 103% para shampoo e 105% para creme). Os parâmetros analíticos obtidos foram: linearidade de $4,97 \times 10^{-7}$ a $4,30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $r=0,9989$; repetibilidade de 2,08% e reprodutibilidade de 4,85%.

Procedimento utilizando CZE foi adaptado[54] para a determinação simultânea de uma mistura de três antifúngicos imidazólicos, econazol, clotrimazol e cetoconazol. A separação foi realizada utilizando uma coluna capilar de sílica fundida, com um tampão de Tris-ácido acético a pH 5,18 e detecção UV a 196 nm. Vários parâmetros eletroforéticos foram investigados: condições de pH e concentração do tampão, tensão aplicada, temperatura e injeção. O método CZE otimizado foi aplicado para a determinação individual dos analitos em formulações farmacêuticas, após uma única etapa de extração em metanol. Os antifúngicos puderam ser determinadas em uma concentração menor do que $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Recuperações de 98,0; 99,9 e 99,6%, coeficientes de variação de 2,25; 2,88 e 1,86% e precisão de 99,9; 100 e 100% foram encontrados para o econazol, clotrimazol e cetoconazol, respectivamente.

Um método espectrofotométrico foi desenvolvido[55] para a determinação de CTZ e clotrimazol em comprimido, creme e loção. O método baseia-se na formação de complexos de cada analito com vermelho de alizarina-S usado como reagente cromogênico em tampão de citrato, que apresentaram um máximo de absorção em 425 nm. O sistema obedece a lei de Beer no intervalo de concentração de 2,50 a 50,0 e 2,70 a 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o clotrimazol e CTZ, respectivamente. As seguintes equações correspondem às faixas lineares de CTZ em pH 2,00 $y=0,0099 \times C \text{ (mg mL}^{-1}) + 0,1044$, $r=0,999$ e clotrimazol $y= 0,013 \times C \text{ (mg mL}^{-1}) + 0,011$, $r=0,999$. O LD encontrado para CTZ foi de 1,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 1,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o clotrimazol.

Um método espectrofotométrico[56] desenvolvido para determinação de CTZ em comprimidos, é baseado em reações de amplificação. O CTZ foi oxidado com periodato, resultando na formação de CTZ^{2+} e íons iodato. As leituras foram feitas em pH 3 e $\lambda = 535$

nm. Uma curva de calibração linear foi obtida entre $0,214 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,70 \mu\text{g mL}^{-1}$; $r = 0,9963$, com absorvidade molar de $5,00 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Um LD de $0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ e DPR 0,90% foram obtidos.

Procedimento espectrofotométrico foi desenvolvido[45] para quantificação de CTZ em comprimidos, utilizando-se HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como diluente e λ para detecção de 223 nm. Os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez foram analisados durante seu desenvolvimento. Ao comparar os resultados obtidos com os resultados da metodologia oficial, no qual utiliza CLAE, não houve diferença significativa entre os valores.

Foram estudadas três metodologias (espectrofotometria no ultravioleta, espectrofotometria no infravermelho e análise térmica) para análise do CTZ em especialidades farmacêuticas[44]. O procedimento espectrofotométrico com detecção em 222 nm, apresentou uma curva analítica entre $4,00$ e $13,00 \text{ mg mL}^{-1}$ que pode ser descrita pela equação $y = 1,03x + 0,596$; $r = 0,9997$, os valores médios da estimativa de desvio padrão foram de $0,800$ e $1,30\%$ e os valores médios de recuperação foram de 100% e 101% para os medicamentos. Neste estudo a espectrofotometria no infravermelho foi utilizada de forma qualitativa, a fim de verificar a presença do CTZ em formas farmacêuticas sólidas. Foi possível observar os estiramentos das funções químicas do fármaco CTZ e distingui-lo do excipiente do medicamento. A curva de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do medicamento mostra a presença dos picos endotérmicos de fusão e exotérmicos de decomposição do CTZ. O deslocamento do pico endotérmico em relação à curva DSC do CTZ padrão ocorre devido à presença da lactose na formulação. Através da DSC e análise térmica diferencial (DTA) foi possível a identificação do CTZ matéria prima e do fármaco presente no medicamento. A curva TG (termogravimetria) do medicamento aponta uma possível interação do medicamento com a lactose, presente como excipiente. Devido à impossibilidade de separar a etapa da perda de massa do CTZ padrão e CTZ medicamento não foi possível quantificar o fármaco pela técnica de termogravimetria. A DTA possibilitou a identificação do CTZ.

Métodos simples de espectrofotometria e de fluorescência são sugeridos[57] para a determinação de cinco fármacos antifúngicos; clotrimazol, nitrato de econazol, cetoconazol, miconazol e tolnaftato. O método espectrofotométrico depende da interação entre as drogas antifúngicas de imidazol com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ). Os cromóforos produzidos obedecem à lei de Beer em λ_{max} 460 e 520 nm, no intervalo de concentração de $22,5$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DDQ. O Método de fluorescência baseia-se na leitura da fluorescência nativa de CTZ a 375 nm com excitação a 288 nm. A intensidade da fluorescência em função da concentração é linear para o CTZ entre $49,7$ e 800 ng mL^{-1} em

pH 10. Os métodos propostos foram aplicados para a determinação dos analitos estudados em suas formulações farmacêuticas.

Um método utilizando Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massa (LC-ESI-MS/MS)[58] foi desenvolvido para a análise simultânea de nove medicamentos básicos (flubendazol, pipamperona, cinarizina, cetoconazol, miconazol, rabeprazol, itraconazol, domperidona e propiconazol) em águas superficiais e efluentes (ETA de uma indústria farmacêutica). O preparo da amostra consistiu em uma extração em fase sólida empregando cartuchos C₁₈. Para a separação dos analitos utilizou-se uma coluna de pentafluorofenil em um tempo total de execução de 24 minutos. As recuperações variaram entre 60,0 e 100%. Devido a diferentes efeitos de matriz medidos em diferentes amostras de água de superfície, o método de adição de padrão foi empregado para a determinação dos analitos.

Estes métodos analíticos citados para a determinação de Cetoconazol estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2- Procedimentos analíticos para determinação de Cetoconazol.

Técnica	Região Linear de resposta	Limite de detecção	Limite de quantificação	Amostra	Recuperação (%)	Ref.
Espectrofluorimetria	49,7 a 800 ng mL ⁻¹	14,9 ng mL ⁻¹	-	Comprimido e creme	98,3 comprimido e 98,4 creme	[57]
CLAE-UV	80,0 a 800 µg mL ⁻¹	10,0 µg mL ⁻¹	-	Comprimido e creme	99,9	[51]
CLAE-UV	12,5 a 500 µg mL ⁻¹	2,50 µg mL ⁻¹	6,25 µg mL ⁻¹	Comprimido e creme	98,2 a 101	[52]
CZE-UV	12,5 a 500 µg mL ⁻¹	6,00 µg mL ⁻¹	12,5 µg mL ⁻¹	Comprimido e creme	95,9 a 104	[52]
Voltametria de onda quadrada	0,26 a 2,28 µg mL ⁻¹	0,06 µg mL ⁻¹	0,20 µg mL ⁻¹	Comprimido	90,8	[53]
CZE-UV	0,42 a 6,38 µg mL ⁻¹	0,33 µg mL ⁻¹	-	Comprimido	99,6	[54]
Espectrofotometria	2,70 a 80,0 µg mL ⁻¹	1,60 µg mL ⁻¹	-	Comprimido e creme	100	[55]
Espectrofotometria	0,21 a 1,71 µg mL ⁻¹	0,13 µg mL ⁻¹	0,17 µg mL ⁻¹	Comprimido	97,8 a 99,9	[56]
Espectrofotometria	2,00 a 6,00 µg mL ⁻¹	0,15 µg mL ⁻¹	0,52 µg mL ⁻¹	Comprimido	99,4 a 100	[45]
Espectrofotometria	4,00 a 13,0 mg mL ⁻¹	-	-	Comprimido	101	[44]
LC-ESI-MS/MS	-	0,005 ng mL ⁻¹	0,01 ng mL ⁻¹	águas superficiais e efluentes	82,1 a 88,1	[58]

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta; CZE – Eletroforese Capilar de Zona; LC-ESI-MS/MS- Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massa;
 - não informado pelo autor.

1.5 Impacto ambiental de desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos e POE são classes de substâncias muito investigadas devido aos seus efeitos no meio ambiente[59]. Há especial interesse científico em um grupo de compostos químicos responsáveis por causar perturbações no sistema endócrino (hormonal) de organismos humanos e animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução: são os chamados perturbadores endócrinos[42, 59].

Essas substâncias constituem uma classe de substâncias definidas não pela sua natureza química, mas pelo efeito biológico ocasionado por elas[60]. Interferem na síntese, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos estrogênios naturais do corpo e abrangem uma grande faixa de classes de estruturas distintas, dentre as quais estão os hormônios estrogênicos ou estrogênios[61] e podem ser de origem antrópica, também denominada xenoestrogênio, ou de origem natural[62, 63].

A exposição destas substâncias pode ocorrer sob diferentes formas, como contato direto, ou indireto, pela ingestão de água, ar ou alimentos contaminados. A água potável é a forma mais significativa de exposição aos desreguladores endócrinos. As águas superficiais e subterrâneas, principais fontes de água potável, podem ser contaminadas pela infiltração de substâncias químicas através do solo, na agricultura ou mesmo em áreas urbanas, ou no descarte de efluentes industrial e doméstico, sendo que muitas dessas substâncias não são removidas pelos processos convencionais de tratamento de água[59]. Uma vez que muitos destes compostos estão presentes em potenciais mananciais de abastecimento de água, é relevante a preocupação com estes compostos por serem uma ameaça potencial à saúde pública[43].

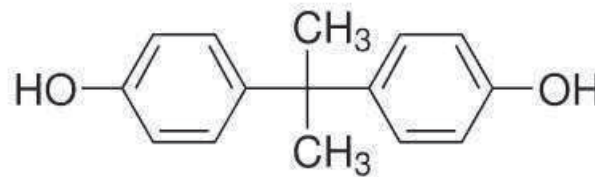
Alguns autores relatam que, dependendo da dose e do tempo de exposição, é possível que essas substâncias estejam relacionadas com o aumento da incidência do câncer de mama, de testículo e de próstata, ovários policísticos, endometriose e redução da fertilidade masculina (redução da quantidade de esperma)[42, 59]. Os seus efeitos são cumulativos e pode ser que eles somente apareçam em gerações futuras[43].

Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas, bisfenol A, substâncias farmacêuticas, entre outras, e ainda substâncias naturais como estrogênios naturais e fitoestrogênios[59]. Dentre essas substâncias destaca-se o bisfenol A (BFA) que tem sido tema de preocupação nos últimos anos por estar presente em muitos produtos utilizados no cotidiano da população mundial, apresenta fluorescência nativa e tem sido muito encontrado em ambientes aquáticos.

1.5.1 Bisfenol A

Os Bisfenóis constituem uma classe de compostos difenilalcanos, sendo o Bisfenol A, nome comum para o 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano (Figura 4)[64]. O BFA é um produto químico muito utilizado pela indústria e em sua forma monomérica é amplamente empregado na produção de resinas epóxi e plásticos de policarbonato[38, 43, 59, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68]. É preparado pela condensação da acetona (de onde advém o sufixo A no final do nome) com dois equivalentes de fenol. Um excesso de fenol costuma ser usado para garantir a condensação completa. O processo pode se dar através de dois métodos, ambos relacionados com a condensação do fenol com acetona em pH ácido, alta temperatura e na presença de catalisadores, sendo que os dois métodos se diferenciam de acordo com o tipo de catalisador e o método de purificação empregado[62, 68, 69].

Figura 4- Estrutura química do Bisfenol A.



BFA é um plastificante sendo adicionado a materiais para aumentar a flexibilidade, a resistência e a maleabilidade da matriz polimérica[62, 68, 70]. Por ser uma substância de excelentes características físicas e químicas, está presente em diversos produtos como mamadeiras, brinquedos, utensílios domésticos, embalagens retornáveis de água, cervejas e refrigerantes, revestimento interno de latas de alimentos e frascos de alimentos para bebês, selantes dentários, embalagens de remédios, esmaltes, materiais retardadores de chama, adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de carros, produtos eletrônicos, fluidos de freio hidráulico, na indústria de pneus, em placas de circuitos impressos, CDs, aditivos de papéis térmicos, plásticos de embalagens de alimentos, tubulações de abastecimento de água[38, 43, 59, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69].

Devido a sua alta produção e pelo fato de ser um produto com diversas aplicações, seu aporte no ambiente ocorre por diferentes fontes. A maior contribuição é devida aos processos de produção e manufatura do BFA, despejos de efluentes industriais sem tratamento adequado. Uma pequena contribuição pode ser atribuída à lixiviação dos produtos finais de consumo. O BFA pode ser encontrado no esgoto doméstico, efluente e lodo biológico de ETE, efluentes de aterros sanitários[43, 59, 60, 61, 62, 67, 68, 70].

O BFA está distribuído na água, solo, sedimento e compartimentos da biota. Com base no valor do coeficiente de partição de 3,32 pode-se esperar que haja adsorção pelos materiais particulados, além de serem lipofílicos e terem o potencial de bioacumulação[43]. O tempo de meia-vida do BFA em águas superficiais é de 1 a 150 dias, e em águas subterrâneas esse tempo pode dobrar. Pode ser decomposto microbiologicamente ou por meio de fotólise pela absorção de energia em 290 nm, sendo que esse potencial é aumentado em matrizes aquáticas com pH básico. Nos solos a meia vida do BFA pode variar de 1 a 180 dias aproximadamente e no ar esse valor é bem menor, entre 0,7 e 7,4 horas, pois nessa matriz é rapidamente decomposto pelos radicais hidroxilas[60].

Devido a sua ampla utilização, a população pode facilmente entrar em contato com o BFA, podendo ser liberado dos diversos produtos que contém o composto, causando problemas para a saúde humana[38, 59]. Baixas doses de BFA têm efeitos adversos sobre a fertilidade, o sistema nervoso, diabetes, câncer, obesidade, puberdade precoce, doenças cardíacas[62, 65]. A dose de referência para exposição oral crônica de BFA foi estabelecida em $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal/dia, pela Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos para os Alimentos[66].

1.5.2 Métodos de determinação de Bisfenol A

Um método utilizando CLAE-UV[71] foi desenvolvido para a determinação de BFA em amostras de água de rio e água de torneira empregando microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) no preparo das amostras. Sob as condições estabelecidas (solvente de extração: $142 \mu\text{L}$ de clorofórmio, solvente dispersor: $2,00 \text{ mL}$ de acetona, e sem adição de sal), a curva de calibração foi linear no intervalo de $0,50$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, com LD de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. O DPR para a extração e determinação de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BFA nas amostras foi de 6,0%. As recuperações variaram de 93,4 a 98,2% (recuperação de 95,3 a 96,6% para amostras de água de rio e 93,4 a 98,2% para amostras de água de torneira).

Amostras de água de três rios do sul da Índia foram analisadas[72] para determinação de resíduos de octilfenol (OP), nonilfenol (NP) e bisfenol A (BFA) por CG-MS. As concentrações de OP, NP e BFA variaram de ND (não detectável) a $16,3 \text{ ng L}^{-1}$, ND a 2200 ng L^{-1} e de $2,80$ a 136 ng L^{-1} ; o LD foi de $1,10 \text{ ng L}^{-1}$, $0,30 \text{ ng L}^{-1}$ e $1,50 \text{ ng L}^{-1}$, o LQ foi de $3,50 \text{ ng L}^{-1}$, $1,10 \text{ ng L}^{-1}$ e $5,10 \text{ ng L}^{-1}$, as recuperações foram de 71,8%, 74,1% e 93,9%, respectivamente. Todos os três rios mostraram uma distribuição padrão semelhante de concentração NP>BFA>OP. Espera-se que estes compostos fenólicos em rios causem potencial toxicidade para os organismos aquáticos, incluindo crustáceos, moluscos, insetos e peixes. Em relação à avaliação de risco aquático, NP mostrou um quociente de risco maior do que OP e BFA, e o maior quociente de risco foi observado para os peixes no rio Kaveri.

Com base na dose diária admissível e de referência, os níveis de dose de BFA e NP são considerados seguros para seres humanos, no entanto, os níveis de NP em algumas amostras de água foram maiores do que o limite de segurança na água para beber ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Um sensor químico tendo como base a reação reversível entre o polímero insolúvel β -ciclodextrina (β -CD) e BFA, foi proposto[73]. Quando imobilizado em cloreto de vinila, membrana de $5 \mu\text{m}$ de espessura, β -CD extrai BFA a partir de soluções aquosas para a fase da membrana e reage com o analito para formar um complexo de inclusão com alta fluorescência. A formação do complexo proporciona uma melhora significativa da fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{ex}} = 286 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 312 \text{ nm}$) para BFA. O sensor de fluorescência exibe uma faixa linear de $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com LD de $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O sensor proposto foi usado para a determinação de BFA em amostras de água de rio e água de torneira com recuperações de 95% e 106%, respectivamente.

BFA na presença de fenol foram determinados[74] utilizando espectrofluorimetria derivativa (derivada primeira). O preparo de amostra utilizado foi uma extração líquido-líquido com éter dietílico. O espectro de excitação de BFA e fenol em éter etílico foram registrados entre 200 e 290 nm, com λ_{em} em 306 nm. Os espectros de primeira derivada foram analisados para BFA em 239 nm. A curva analítica foi linear de 0,50 a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Um DPR de 2,9% para uma concentração de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de BFA e um LD de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos. O método proposto foi aplicado para a determinação do BFA em misturas sintéticas e amostras de água de diferentes fontes previamente enriquecidas com diferentes quantidades dos analitos. As recuperações variam de 93,0% a 112% (93,0-103% para água de rio, 96,7-112% para água do mar e 98,6-105% para água subterrânea).

Um procedimento eletroquímico[75] foi desenvolvido para a detecção específica de BFA em amostras reais. Um eletrodo de pasta de carbono modificado foi elaborado utilizando β -CD. Análises de voltametria e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas. A introdução de β -CD como um modificador exibiu maior sensibilidade e seletividade para o BFA ao longo do intervalo de concentração de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um LD de $8,30 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e a recuperação variou de 96,3 a 103% (103% para água de torneira, 97,2% para água de rio, 96,3% para garrafa de água PC e 99,6% para de embalagem de alimentos PVC).

Um procedimento foi desenvolvido[40] para a determinação de BFA, 4-n-nonilfenol (4-NP) e 4-terc-octilfenol (4-OP) em amostras de água utilizando HPLC com detector de fluorescência (FLD). Neste trabalho, 1-octil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ($[\text{C}_8\text{MIM}][\text{PF}_6]$) foi usado como solvente de extração. Parâmetros que afetam a eficiência da extração, tais como o volume de $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{PF}_6]$, temperatura, tempo de extração, pH da amostra,

tempo de centrifugação e dessalinização foram investigados detalhadamente. Sob as condições otimizadas, uma curva analítica foi encontrada na faixa de concentração de 1,00-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BFA, 1,50-150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 4-NP, e 3,00-300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 4-OP. Os LDs de 0,23; 0,35 e 0,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos respectivamente para o BFA, 4-NP e 4-OP. Os valores de recuperação para os 3 analitos variam de 82,8 a 117% para as amostras de água. Detalhadamente, BFA, 4-NP e 4-OP apresentaram as seguintes faixas de recuperação, respectivamente, 96,5-110%, 97,2-110% e 96,4-111% para água de drenagem; 86,9-116%, 86,7-117% e 85,4-114% para águas residuais; 95,2-109%, 93,7-108% e 94,9-109% para água de neve derretida; e recuperações de 85,1-116%, 83,1-117% e 82,8-114% para água de rio.

Um método analítico foi desenvolvido[76] para a determinação simultânea de BFA, bisfenol F (BPF) e seus correspondentes éteres diglicidílicos (BADGE e BFDGE) em efluentes e água de rio por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência (HPLC-FL). Utilizou-se extração com ácido decanóico e o procedimento envolveu a extração de 10,8 mL de amostra de água durante 5 minutos e centrifugação por 10 minutos para acelerar a separação das fases. As extrações foram independentes da adição de sal, a temperatura de até 60 °C em pH inferiores a 4. Recuperações das amostras variaram entre 80 e 96% (80 a 88% para BFA, 78 a 82% para BPF, 90 a 96% para BADGE e 87 a 92% de BFDGE para águas de rio e efluentes, com LD de 30 a 35 ng L^{-1}). Bisfenóis e os seus éteres diglicidílicos estavam presentes em águas residuais de efluentes em concentrações na faixa de 0,96-1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O método analítico desenvolvido[77] permitiu a extração e quantificação simultânea de diferentes estrogênos (estradiol, estrona, estriol, estradiol-17-glicuronídeo, diacetato de estradiol, estrona-3-sulfato, etinilestradiol e dietilestilbestrol), pesticidas e bisfenol A em águas naturais. No método desenvolvido, 500 mL de água são pré-concentrados em cartuchos C18. Análises foram realizadas por LC-MS, usando Electrospray (ESI) para determinação de estrogênios e BFA e usando Ionização à pressão atmosférica (API) para a determinação de pesticidas. As recuperações para a maioria dos compostos ficaram entre 90 e 119%, exceto para o bisfenol A (81%) e dietilestilbestrol (70%), com DPR inferior a 20% para todos os analitos (8% para BFA). Os LDs variaram entre 2,00 e 15,0 ng L^{-1} para todos (6,30 ng L^{-1} para BFA).

Um sensor químico por detecção espectrofluorimétrica foi desenvolvido[78] para monitoramento do BFA. O sensor foi proposto com base na supressão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}=286 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=390 \text{ nm}$) a partir da associação pireno/dimetil- β -ciclodextrina (HDM- β -CD) um complexo supramolecular imobilizado em cloreto de vinila, no qual o pireno serviu como um indicador de fluorescência. O sensor exibiu uma curva analítica de $7,90 \times 10^{-8}$ a $1,66 \times 10^{-5} \text{ mol}$

L⁻¹, com um LD de $7,00 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Foi usado para a determinação de BFA em amostras de água de rio, água de torneira, água da chuva e água de nascente com recuperação de 94,0 a 106% (94,0-106% para água de rio, 96,0-105% para água de torneira, 97,0-105% para água da chuva e 98,0-106% para água de nascente).

As concentrações de Nonilfenol (NP) e BFA foram investigadas[79] em água e sedimentos dos 16 principais rios de Taiwan para determinar sua associação com os parâmetros de qualidade da água no processo de distribuição. A técnica utilizada foi a cromatográfica (LC/ESI/MS/MS). Os resultados mostraram que as concentrações de NP e BFA estavam na faixa de 0,02 a 3,94 e 0,01 a 44,65 µg L⁻¹ em água e 6,59 a 47797,69 e 0,37 a 491,54 µg kg⁻¹ em sedimentos. Os LDs foram de 2,13 e 2,09 ng L⁻¹ para água, e 0,127 e 0,126 µg kg⁻¹ para sedimentos, respectivamente. As recuperação médias para NP foram $80,4 \pm 5,2\%$ em água e $83,5 \pm 2,9\%$ em sedimentos, enquanto que para BFA foram $76,3 \pm 9,1\%$ em água e $98,4 \pm 1,9\%$ em sedimentos. Altos níveis de NP e BFA em água e sedimentos foram medidos em locais altamente industrializados e áreas urbanizadas. A ocorrência de NP e BFA nas amostras foram determinados principalmente com relação aos teores de carbono orgânico nos sedimentos e diversos parâmetros de qualidade de água, tais como oxigênio dissolvido, pH, concentrações de amônia-nitrogênio e carbono orgânico total na água.

Um método fluorimétrico envolvendo cinética inibitória foi proposto[80] para determinação de BFA. Um radical peróxido produzido por reagente de Fenton ($\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$) oxida a Rodamina 6G e produz a extinção da sua fluorescência, além disso o BFA tem um efeito inibidor sobre a reação redox. A inibição da fluorescência da rodamina 6G é medida pelo método de tempo de correção. Sob as condições experimentais otimizadas, o LD e o LQ para o BFA foram 2,00 e 6,70 ng mL⁻¹, respectivamente. Uma curva analítica foi obtida entre 0,024 e 0,40 µg mL⁻¹. O método proposto foi utilizado para a determinação de BFA em amostras líquidas e sólidas com recuperação de 92,5 a 110,0% (água de torneira 105%, água de superfície 92,5%, água de rio 95%, águas residuais 110%, sedimentos 95,0%, solo genérico 97,5%, mamadeira 96,3%, aspirador nasal 105%, garrafa de bebida 95,0% e obturação dentária 98,8%).

Estes métodos analíticos citados para a determinação de Bisfenol estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3- Procedimentos analíticos para determinação de Bisfenol A em água de rio.

Técnica	Região Linear de resposta	Limite de detecção	Preparo de amostra	Recuperação (%)	Ref.
CLAE-UV	0,50 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva	95,3 a 96,6	[71]
CG-MS	5,00 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,50 ng L^{-1}	Extração em fase sólida (cartucho C18)	93,9	[72]
Espectrofluorimetria	1,37 a 228 $\mu\text{g L}^{-1}$	228 $\mu\text{g L}^{-1}$	Filtração (filtro de membrana de 0,45 μm)	95,0	[73]
Espectrofluorimetria	0,50 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$	Microextração líquido-líquido	93,0 a 103	[74]
Voltametria cíclica	22,8 a 2511 $\mu\text{g L}^{-1}$	18,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	Filtração (filtro Millipore 0,22 μm)	97,2	[75]
HPLC-FL	1,00 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$	Micro extração líquido-líquido dispersiva	85,1 a 116	[40]
HPLC-FL	10,0 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,035 $\mu\text{g L}^{-1}$	Extração com ácido decanóico dissolvido em THF seguido por centrifugação	81,0 a 85,0	[76]
LC-ESI-MS	0,005 a 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	6,30 ng L^{-1}	Extração em fase sólida	81,0	[77]
Espectrofluorimetria	18,0 a 3789 $\mu\text{g L}^{-1}$	15,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	Filtração (filtro de acetato de celulose de 0,45 μm)	94,0 a 106	[78]
Voltametria cíclica	2,97 a 2257 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	97,0	[81]
LC-ESI-MS/MS	1,25 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,09 ng L^{-1}	Cartuchos de extração em fase sólida	76,3	[79]
Espectrofluorimetria	20,8 a 330 $\mu\text{g L}^{-1}$	13,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	85,9 a 109	[82]
Espectrofluorimetria	24,0 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	Filtração	95,0	[80]

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta; CG-MS- Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa; HPLC-FL Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência; LC-ESI-MS- Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electro spray acoplada à Espectrometria de Massa; - não informado pelo autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolvimento de procedimentos analíticos empregando espectroscopia molecular (absorção e emissão molecular) para determinação de analitos de interesse alimentício, ambiental e farmacêutico:

- Butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT) em amostras alimentícias, empregando espectrofotometria de absorção molecular;
- Cetoconazol (CTZ) em amostras de águas e produtos farmacêuticos, empregando espectroscopia de emissão molecular;
- Bisfenol A (BFA) em amostras de águas, empregando espectroscopia de emissão molecular.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Butil hidroxianisol e Butil hidroxitolueno

- Avaliar o comportamento espectrofotométrico do BHA e BHT.
- Analisar o efeito de diferentes marcas de solventes sobre o espectro de absorção do BHA e BHT.
- Validar o procedimento de espectroscopia derivativa de primeira ordem para a determinação de BHA-BHT simultaneamente utilizando a técnica zero crossing.

2.2.2 Cetoconazol

- Avaliar o comportamento espectrofluorimétrico do cetoconazol.
- Analisar o efeito de diferentes pHs no meio reacional sobre o espectro de emissão do CTZ.
- Avaliar o efeito dos interferentes produzidos pela hidrólise ácida e oxidação sobre a intensidade de fluorescência do CTZ.
- Investigar a fotodegradação do CTZ com radiação ultra violeta (UV).
- Validar o procedimento espectrofluorimétrico proposto.

2.2.3 Bisfenol A

- Avaliar o comportamento espectrofluorimétrico do Bisfenol A
- Analisar o efeito de diferentes solventes sobre a intensidade de fluorescência do BFA.
- Validar o procedimento espectrofluorimétrico para determinação de BFA.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica da marca Bioprecisa[®] (modelo FA104N) com precisão de $\pm 0,10$ mg.

Um banho ultrassônico (Cristófilo) foi utilizado para dissolução dos reagentes.

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

A avaliação da fotodegradação do CTZ foi realizada em uma câmara de irradiação construída em madeira, contendo uma lâmpada fluorescente de mercúrio de 28 W de potência.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-Vis Cary, modelo 50 CONC (Varian[®]) com cubeta de quartzo de 3,50 mL (caminho óptico 10 mm).

As medidas de emissão foram obtidas utilizando um espectrofluorímetro (Varian[®] Cary Eclipse) equipado com uma lâmpada de xenônio. Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com quatro faces polidas (caminho óptico de 10 mm) e volume de 3,50 mL.

3.2 Espectrofotometria derivativa para determinação de BHA e BHT em amostras alimentícias

3.2.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de BHA $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada do reagente (Aldrich, 98,5% de pureza) em etanol. As soluções de

trabalho foram preparadas por diluições da solução estoque em balões de 10,0 mL, completando-se o volume com etanol.

A solução estoque de BHT $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada do reagente (Aldrich, 98,0% de pureza) em etanol. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições da solução estoque em balões de 10,0 mL, completando-se o volume com etanol.

3.2.2 Amostras de maionese e molho de salada

Para determinação de BHA e BHT as seguintes amostras adquiridas em supermercados locais de Dourados-MS foram analisadas:

- Maionese Hellmann's (Unilever Brasil Industrial Ltda, Goiás);
- Maionese Arisco (Unilever Brasil Industrial Ltda, Goiás);
- Molho para salada Parmesão (Unilever Brasil Industrial Ltda, Goiás).

3.2.3 Preparo das amostras

As amostras de maionese e molho de salada contendo BHA e BHT foram preparadas empregando etanol como solvente. Para o preparo destas amostras, cerca de 1,0 g de amostra foram dissolvidas com 5,00 mL de etanol em tubo de centrífuga. Após agitação por 5 minutos a amostra foi então centrifugada por 10 minutos a 3600 rpm para a separação do óleo e do extrato etanólico formado. O extrato etanólico foi coletado e transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com etanol. Em seguida, obteve-se os espectros de absorção.

3.2.4 Medidas espectrofotométricas

Os espectros de absorção das soluções de amostras e das soluções padrão contendo os antioxidantes BHA e BHT foram obtidos na região entre 200 e 350 nm. Na sequência, obteve-se a 1ª derivada destes espectros. Utilizando o método do *zero crossing*, determinou-se os dois comprimentos de onda de anulação para os componentes da mistura binária, para posterior construção das curvas de calibração.

Duas curvas analíticas foram obtidas:

- Uma curva para o BHA a partir dos espectros de primeira ordem da mistura das duas soluções estoque de BHA e BHT.
- Uma curva para o BHT a partir dos espectros de primeira ordem da mistura das duas soluções estoque de BHA e BHT.

3.3 Desenvolvimento de procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de cetoconazol em águas de superfície e formulações farmacêuticas

3.3.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de CTZ $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada do reagente (Galena, Campinas-SP, lote KET/M-10610) em HCl 0,10 mol L⁻¹. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições da solução estoque em balões de 5,00 mL, completando-se o volume com solução tampão fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,10 mol L⁻¹, pH 9,00.

As soluções tampão de pH 4,00 e 5,00 foram preparadas pela mistura de solução de ácido acético glacial 0,20 mol L⁻¹ (Vetec, 99,7% de pureza, $\rho = 1,049$ g mL⁻¹ a 25° C) com solução de acetato de potássio 0,20 mol L⁻¹ (Synth, 99% de pureza).

Para as soluções tampão de pH 6,00 a 8,00 utilizou-se a solução de KH₂PO₄ 0,10 mol L⁻¹ (Vetec, 99% de pureza).

As soluções tampão de pH 9,00 e 10,0 foram preparadas com a mistura das soluções de cloreto de potássio (KCl) 0,10 mol L⁻¹ (Vetec, 99% de pureza) e solução de ácido bórico (H₃BO₃) 0,10 mol L⁻¹ (Sigma, 99% de pureza).

O ajuste do pH destas soluções foram realizados com a adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,10 mol L⁻¹ (Vetec, 98% de pureza).

3.3.2 Amostras farmacêuticas e de água de rio

As amostras dos medicamentos contendo CTZ foram obtidos no comércio local em Dourados - MS:

- Cetomed[®] (CIMED Indústria de Medicamentos Ltda, Minas Gerais) contendo 30 comprimidos com 200 mg de Cetoconazol por comprimido;
- Cetoconazol[®] (Laboratório TEUTO Brasileiro S/A, Goiás) contendo 30 comprimidos com 200 mg de Cetoconazol por comprimido;
- Cetoconazol[®] (EMS S/A, São Paulo) contendo 30 comprimidos com 200 mg de Cetoconazol por comprimido.

Foram pesados e triturados 5 comprimidos de cada amostra (amostra A, B e C) em almofariz. Massas exatamente pesadas do pó contendo CTZ foram dissolvidas em HCl 0,10 mol L⁻¹ e transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL, afim de obter uma concentração final de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Após 5 minutos de tratamento em banho de ultrassom, a suspensão resultante foi filtrada.

Após o preparo das amostras, alíquotas destas soluções preparadas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume completado com solução tampão pH 9,00 (mistura das soluções de KCl 0,10 mol L⁻¹ e solução de ácido bórico 0,10 mol L⁻¹).

3.3.3 Água de rio

As amostras de água de rio utilizadas para determinação de Cetoconazol e Bisfenol A foram provenientes dos córregos Rego d'a Água e Água Boa, localizados dentro do perímetro urbano (Dourados/MS). Cada local de coleta acompanha suas respectivas coordenadas geográficas (latitude e longitude) totalizando quatro locais de coletas, que serão descrito a seguir:

Ponto da Coleta	Localização Geográfica
Ponto A	22°15'30"S e 4°49'7"W
Ponto B	22°15'3"S e 4°49'36"W
Ponto C	22°13'41"S e 54°49'48"W
Ponto D	22°15'20"S e 54°49'11"W

Os pontos A, B e D estão dentro de um bairro de alta densidade populacional na periferia da cidade. O ponto C é uma nascente que esta localizada dentro do Parque Antenor Martins. Todos os pontos de coleta estão em área de preservação ambiental.

As amostras foram coletadas em frascos âmbar de 1,00 L, mantidas em ambiente recoberto com papel alumínio durante o transporte e armazenamento. Para a retirada de partículas em suspensão das amostras, foi realizada uma filtração simples com filtro de membrana poliestersulfônico (PES) com porosidade de 0,22 µm e área de filtração de 6 cm².

3.3.4 Preparação do produto de degradação ácida e de oxidação do Cetoconazol

Este estudo foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito dos produtos de degradação do CTZ durante a sua determinação empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto.

Avaliou-se o efeito de uma solução de CTZ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ levada a hidrólise ácida, com HCl 0,1 mol L⁻¹, e também o efeito de uma solução levada a oxidação, com peróxido de hidrogênio.

Os produtos da hidrólise foram obtidos mantendo a solução padrão em ebulição sob refluxo por 30 minutos. Já os produtos de degradação por oxidação, foram obtidos adicionado-se 1,00 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e mantendo-se a solução sob refluxo por 30 minutos. As soluções resultantes foram resfriadas e alíquotas apropriadas foram diluídas com solução tampão pH 9,00.

Com a finalidade de verificar o efeito dos produtos da fotólise do CTZ na determinação do analito, pesou-se 1,00 g de reagente em vidro de relógio e deixou-se sob exposição de radiação UV durante 24 horas. A fonte de radiação foi uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão instalada no interior de uma caixa de madeira.

3.4 Desenvolvimento de procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de bisfenol A em águas de superfície

3.4.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de BFA $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada do reagente (Aldrich, 97% pureza) em etanol. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições da solução estoque em balões de 5,00 mL, completando-se o volume com etanol. Todas as soluções foram protegidas com papel alumínio e armazenadas sob refrigeração.

3.4.2 Amostras de água de rio

Utilizou-se para a determinação de BFA, as mesmas amostras de água de rio utilizadas para determinação de CTZ, já citadas anteriormente, seguindo o mesmo método de preparo de amostra.

3.4.3 Efeito do solvente sobre a intensidade de emissão do Bisfenol A

Para o estudo do efeito do solvente sobre a intensidade de emissão transferiu-se alíquotas de solução padrão de BFA para balões volumétricos de 5,00 mL, no qual foi adicionado diferentes volumes de etanol. A concentração de BFA foi de 3×10^{-6} mol L⁻¹ e as concentrações finais de etanol foram 25, 50, 75 e 100%. Os espectros de emissão destas soluções foram obtidos com excitação de 276 nm. Na sequência, foram avaliados o efeito de metanol, acetonitrila e uma segunda marca de etanol sobre a intensidade de emissão de uma solução padrão de BFA $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

3.4.4 Procedimento para determinação dos analitos por espectrofluorimetria

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de excitação e emissão do CTZ, efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o comprimento de onda de excitação em 237 nm e monitorando-se a emissão entre 200 a 700 nm. Os espectros de emissão foram obtidos para solução de CTZ $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão pH 9,00 (mistura das soluções de KCl $0,10$ mol L⁻¹ e solução de ácido bórico $0,10$ mol L⁻¹).

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de excitação e emissão do BFA, efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o comprimento de onda de excitação em 276 nm e variando a emissão de 200 a 700 nm. As leituras foram realizadas em solução de BFA $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em etanol.

As fendas de emissão e de excitação, bem como os filtros foram estabelecidos de modo a fornecer a melhor sensibilidade. As fendas de excitação e de emissão foram selecionadas em 5 nm e a tensão do tubo fotomultiplicador foi mantida a 600 V.

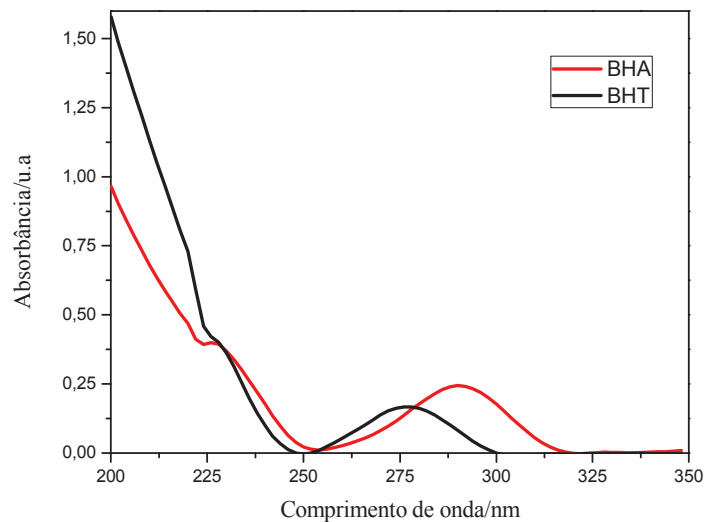
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Espectrofotometria derivativa para determinação de BHA e BHT em amostras alimentícias

O espectro de absorção dos antioxidantes na região ultravioleta do espectro eletromagnético foi avaliado utilizando-se uma solução padrão de BHA $5,55 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e de BHT $9,08 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os espectros das soluções em meio etanólico foram obtidos entre 200 e 350 nm e o etanol foi utilizado como branco nas leituras. Pode ser verificado na Figura 5 uma banda de máxima absorção para cada antioxidante, em 291,0 nm para o BHA e em

278,0 nm para o BHT. Os espectros estão muito sobrepostos, diferindo apenas em 13 unidades de comprimento de onda (λ), o que dificulta a análise quantitativa da mistura destes dois antioxidantes por espectrofotometria de ordem zero (convencional). Assim, utilizou-se a espectrofotometria derivativa como uma alternativa para determinação simultânea dos antioxidantes.

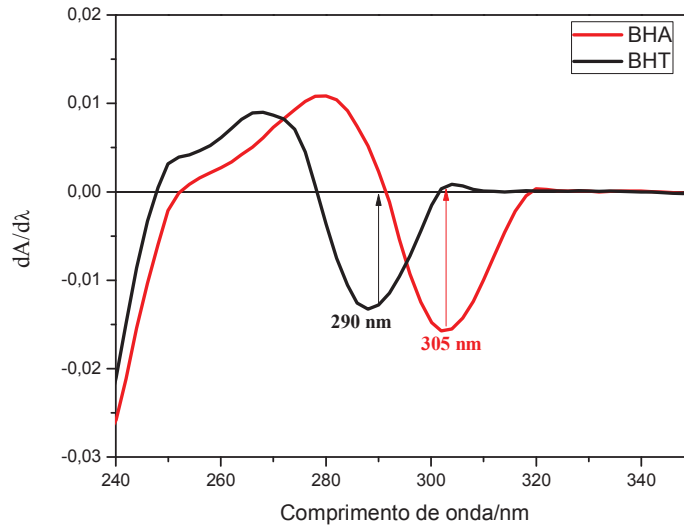
Figura 5- Espectros de absorção obtidos em etanol de ordem zero do BHA $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e do BHT $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Os espectros de ordem zero foram derivados e são mostrados na Figura 6. Verifica-se que o perfil da primeira derivada dos espectros possibilita identificar a contribuição de cada antioxidante numa mistura dessas substâncias. Desta maneira, é possível a análise quantitativa dos dois analítos simultaneamente utilizando-se o método *zero crossing*.

Observa-se nos espectros da Figura 6 que, em certos λ , ocorre a anulação do espectro de um componente enquanto há absorção do outro. Deste modo, sobrepondo-se várias derivadas de concentrações crescentes de cada componente e, obtendo-se os valores das amplitudes nos pontos de anulação (*zero crossing*), é possível construir-se curvas de calibração, além de se eliminar eletronicamente os erros sistemáticos provenientes de interferências (*overlapping*)[3].

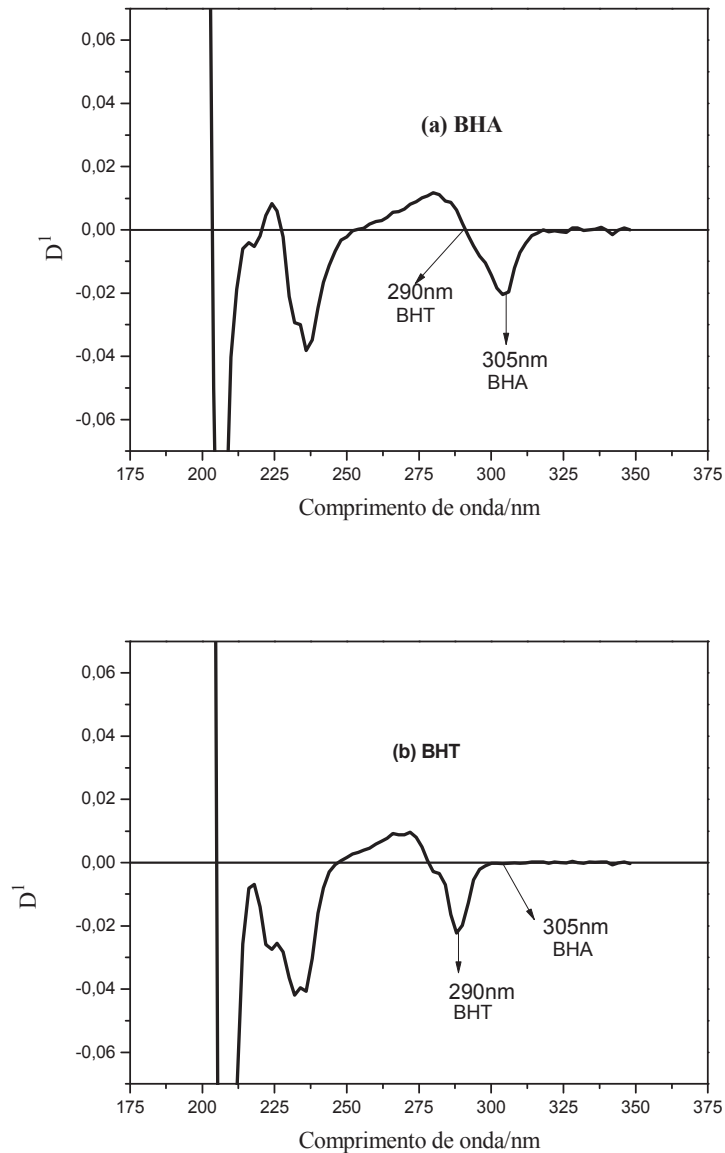
Figura 6- Espectros de absorção da primeira derivada de uma solução contendo a mistura dos antioxidantes BHA $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e BHT $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Ao analisar a mistura binária dos antioxidantes foi preciso obter o sinal no comprimento de onda em que a contribuição de um dos componentes da mistura foi zero. Estes comprimentos de onda foram previamente estabelecidos para cada um dos antioxidantes, sendo 305 nm para o BHA e 290 nm para o BHT; desta forma as bandas ficam completamente separadas, sem nenhuma interferência do espectro de um antioxidante na banda do outro (Figura 6).

Os valores das derivadas foram utilizados na construção de curvas de calibração para a determinação de BHA e BHT. Os sinais para a determinação de BHA nas amostras foram obtidos à 305 nm, *zero crossing* do BHT (Figura 7 (a)). Os sinais para a determinação do BHT foram obtidos utilizando o λ de 290 nm no espectro de primeira ordem, ou seja, nesse comprimento o BHA não absorve radiação ultravioleta (Figura 7 (b)).

Figura 7- Espectros da derivada primeira do BHA (a) e do BHT (b) obtidos separadamente em etanol.



4.1.1 Efeito do solvente sobre o espectro de absorção

Construiu-se curvas analíticas de ordem zero (Tabela 4) com 2 solventes, etanol e metanol, sendo que as curvas em etanol foram feitas em 2 marcas diferentes (etanol A e etanol B). Observa-se que as curvas analíticas de ordem zero não apresentaram diferenças significativas em relação a inclinação, intercepto ou r , tanto para o BHA quanto para o BHT, indicando que o método apresenta boa precisão. O DPR dos coeficientes angulares é de 7,13% para o BHA e de 5,27% para o BHT, indicando que a variação não foi significativa quando comparamos os resultados dos dois solventes.

A espectroscopia derivativa foi utilizada para o estudo do efeito da marca do solvente. A Tabela 5 mostra as curvas de primeira derivada comparando-se os resultados em duas marcas de etanol. Assim como na espectrofotometria tradicional, o método proposto também apresentou boa sensibilidade.

Tabela 4- Equações das curvas analíticas de ordem zero obtidas para os antioxidantes em metanol e em duas marcas diferentes de etanol.

Equação da curva analítica		
Solvente	BHA	r
Etanol A*	Abs= 3351,44 (\pm 87,52) \times C + 0,0281 (\pm 0,016)	0,998
Etanol B**	Abs= 3803,45 (\pm 80,98) \times C + 0,098 (\pm 0,003)	0,998
Metanol	Abs= 3389,69 (\pm 247,91) \times C - 0,0346 (\pm 0,048)	0,992
BHT		
Etanol A*	Abs= 1692,79 (\pm 58,67) \times C + 0,0503 (\pm 0,0177)	0,998
Etanol B**	Abs= 1873,44 (\pm 12,84) \times C + 0,057 (\pm 0,0153)	0,999
Metanol	Abs= 1742,56 (\pm 45,93) \times C + 0,0253 (\pm 0,0145)	0,998

*Etanol A refere-se à marca Vetec e **Etanol B refere-se à marca CRQ.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros (curvas de calibração, coeficiente de regressão e marca/tipo de solvente) que possibilitam a determinação simultânea dos antioxidantes BHA e BHT pelo método da primeira derivada. O DPR dos coeficientes angulares é de 1,14% para o BHA e de 6,90% para o BHT após a derivação. Verifica-se que a repetibilidade das curvas analíticas aumentam com a derivação dos espectros puros.

Tabela 5- Equações das curvas analíticas da primeira derivada para a mistura dos antioxidantes BHA e BHT em duas marcas de etanol.

Equação da curva analítica		
Solvente	BHA	r
Etanol A*	$dA/d\lambda = 291,21 (\pm 6,43) \times C + 0,021 (\pm 0,001)$	0,999
Etanol B**	$dA/d\lambda = 296,90 (\pm 5,62) \times C + 0,019 (\pm 0,001)$	0,999
BHT		
Etanol A*	$dA/d\lambda = 150,48 (\pm 3,66) \times C + 0,030 (\pm 0,001)$	0,999
Etanol B**	$dA/d\lambda = 165,93 (\pm 8,26) \times C + 0,040 (\pm 0,003)$	0,995

*Etanol A refere-se a marca Vetec e **Etanol B refere-se a marca CRQ.

4.1.2 Parâmetros de confiabilidade analítica

As Figuras 8 e 9 apresentam os espectros de ordem zero obtidos para cinco concentrações de BHA e de BHT isoladamente. Observa-se que as concentrações são proporcionais as absorbâncias. O método espectrofotométrico convencional, de ordem zero, funciona muito bem para os referidos analitos, desde que estejam separados um do outro na amostr. Quando os dois antioxidantes são misturados, torna-se totalmente inviável a determinação, fato que fica evidente na Figura 10 (a), na qual as bandas de BHA e do BHT estão completamente sobrepostas, não é possível diferenciar as duas bandas, o espectro parece ter apenas uma substância, o que induz ao erro, e não permite a identificação correta de cada componente.

Figura 8- Espectro de absorção de ordem zero para a curva analítica do BHA em etanol. (a) branco, (b) $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $1,11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $1,66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $2,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $2,77 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

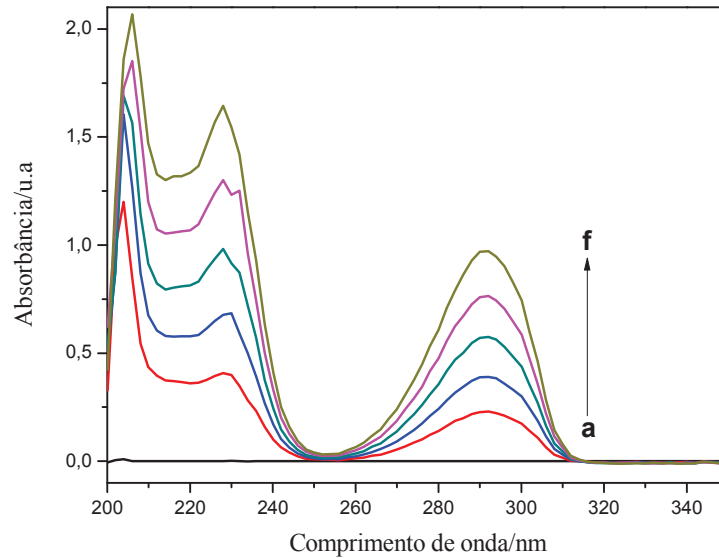
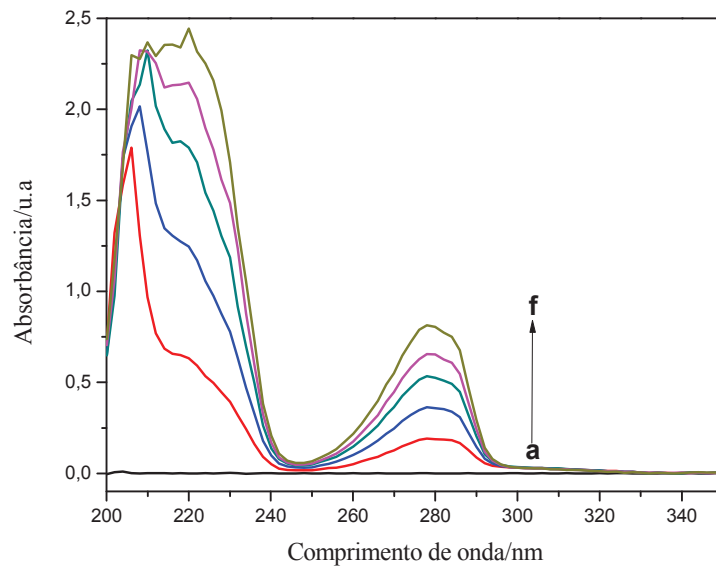
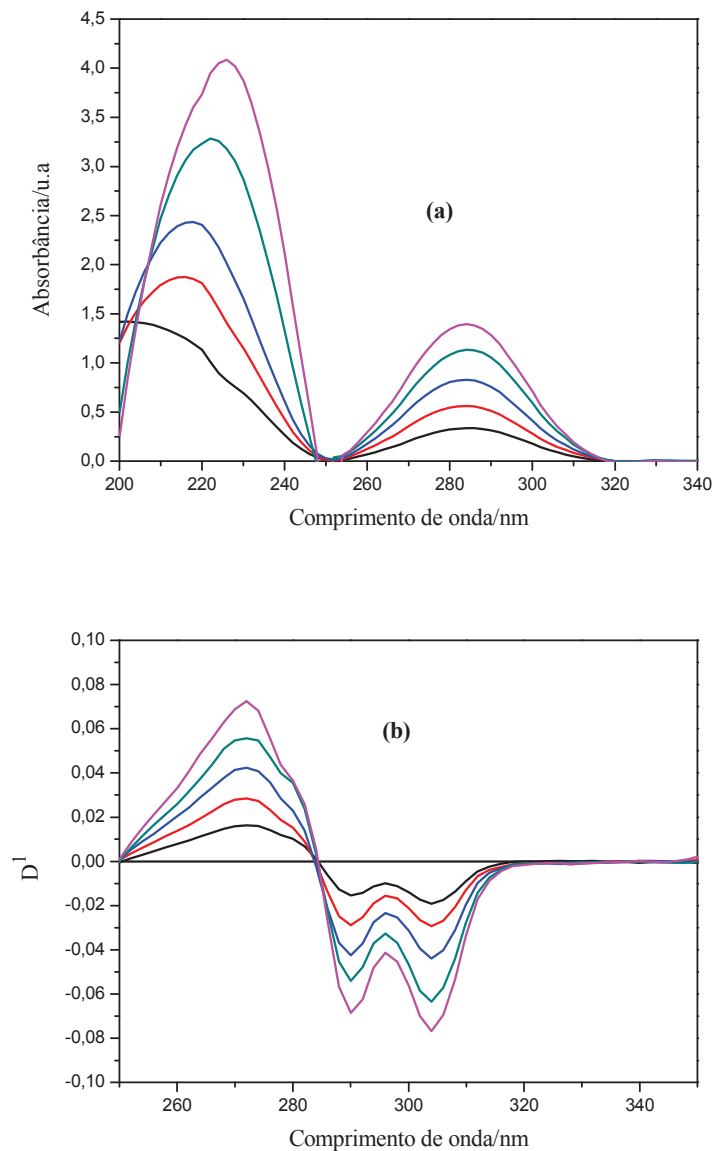


Figura 9- Espectro de absorção de ordem zero para a curva analítica do BHT em etanol. (a) branco, (b) $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $1,81 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $3,63 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $4,54 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



A Figura 10 (b) apresenta os espectros derivados para diferentes concentrações da mistura binária dos antioxidantes, mostrando a proporcionalidade entre as derivadas $dA/d\lambda$ e as concentrações dos analitos. Após a derivação do espectro, as duas bandas ficam nítidas e satisfatoriamente separadas, o que permite identificar, bem como quantificar cada antioxidante presente na mistura.

Figura 10- Espectro de absorção de ordem zero (a) e da primeira derivada (b) para a curva analítica da mistura de antioxidantes BHA e BHT em etanol.



Utilizando os parâmetros químicos previamente otimizados, foi avaliada a linearidade do procedimento espectrofotométrico clássico (de ordem zero) e de sua respectiva derivada primeira, monitorando-se o sinal de absorção de diferentes concentrações de soluções padrão dos antioxidantes. A partir dos valores de absorbância da curva do espectro de absorção de ordem zero do BHA e do BHT, construiu-se curvas analíticas derivadas. As curvas analíticas da primeira derivada são apresentadas nas Figuras 11 e 12, cada ponto representa a média de duas medidas experimentais.

Figura 11- Curva analítica da primeira derivada para a determinação de BHA em meio de etanol.

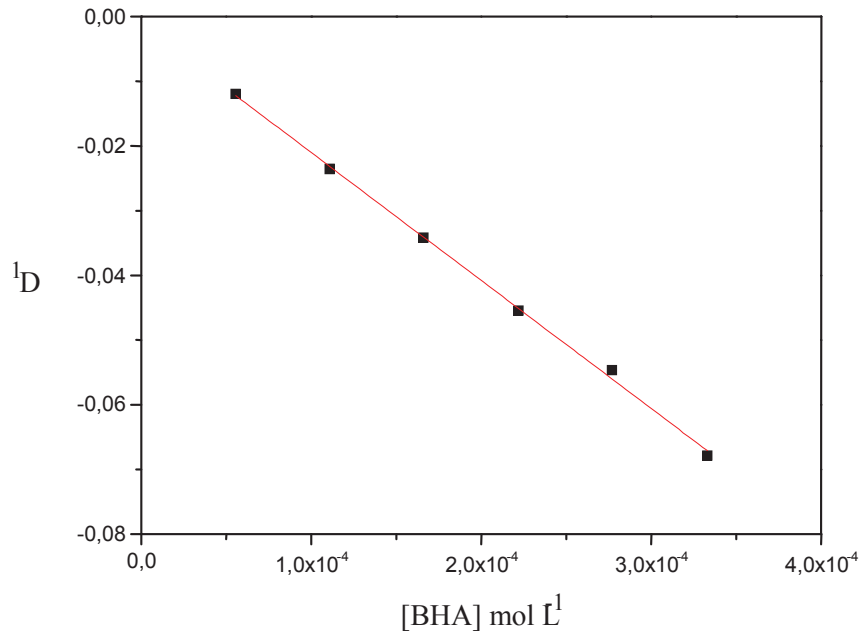
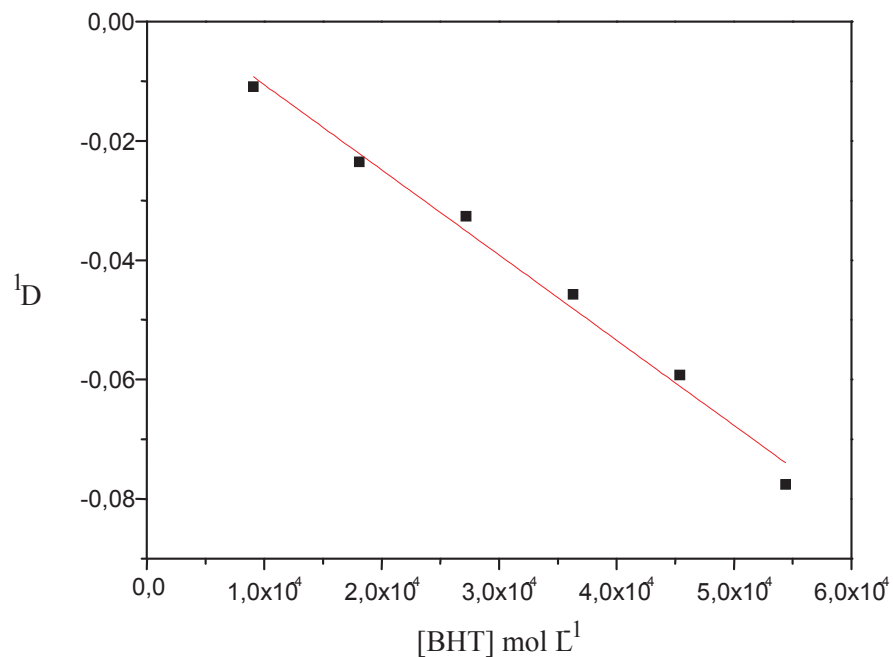


Figura 12- Curva analítica da primeira derivada para a determinação de BHT em meio de etanol.



A partir da técnica de anulação (*zero crossing*), isto é, lendo-se as amplitudes de absorção de um componente no comprimento de onda de anulação do outro, são construídas curvas de calibração com a finalidade de se determinar a linearidade do método e permitir a análise quantitativa do produto acabado [3]. As Figuras 11 e 12 mostram as curvas de calibração obtidas para BHA e BHT utilizando a primeira derivada. Para aplicação

desta metodologia, foram obtidas curvas analíticas a partir de soluções padrão dos antioxidantes de interesse em seguida utilizaram-se cálculos matemáticos para a derivação. Os valores de absorvância para primeira derivada do espectro foram obtidos em 305 nm para o BHA e 290 nm para o BHT.

As curvas de calibração apresentaram linearidade aceitável dentro da faixa de concentração estudada (Tabelas 4 e 5), com coeficientes de regressão maiores que 0,99, dentro da faixa estabelecida pela ANVISA ($r > 0,99$)[83].

Análises de variância foram realizadas com os dados das curvas analíticas do BHA e do BHT ao utilizar o método de espectrofotometria derivativa. A variância permite avaliar a significância da regressão. Como mostrado nas Tabelas 6 e 7, os elevados valores de F (2792,70 e 465,51) indicam a existência de uma relação linear entre a primeira derivada e a concentração, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o recomendado (2,776).

Tabela 6- Análise de variância da curva analítica para o BHA utilizando-se a espectrofotometria derivativa de primeira ordem.

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	$4,75 \times 10^{-3}$	$4,75 \times 10^{-3}$	2792,70	$7,67 \times 10^{-7}$
Resíduo	4	$6,81 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$		
Total	5	$4,76 \times 10^{-3}$			

Tabela 7- Análise de variância da curva analítica para o BHT utilizando-se a espectrofotometria derivativa de primeira ordem.

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	$6,71 \times 10^{-3}$	$6,71 \times 10^{-3}$	465,51	$2,73 \times 10^{-5}$
Resíduo	4	$5,77 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-5}$		
Total	5	$6,77 \times 10^{-3}$			

A faixa linear, o limite de detecção e quantificação calculados para o método proposto foram de $5,55 \times 10^{-5}$ a $3,33 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (10,0 a 60,0 µg mL⁻¹), $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (4,56 µg mL⁻¹) e $6,67 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (12,0 µg mL⁻¹), respectivamente para BHA e $9,08 \times 10^{-5}$ a $5,44 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (20,0 a 120 µg mL⁻¹), $4,77 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (10,5 µg mL⁻¹) e $1,44 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (31,7 µg mL⁻¹) para BHT.

O limite de detecção foi determinado para cada antioxidante considerando a mistura binária de interesse, a partir de 10 medidas do branco do procedimento, obtendo-se a média e o desvio padrão desse conjunto de medidas. O limite de detecção foi calculado (3x desvio padrão do erro do intercepto + intercepto/inclinação da curva analítica), e de modo semelhante, estimou-se o limite de quantificação para os antioxidantes de interesse (10x desvio padrão do erro do intercepto + intercepto/inclinação da curva analítica).

As figuras de mérito avaliadas, limite de detecção, limite de quantificação e faixa linear para a espectrofotometria de ordem zero e de primeira ordem, são apresentados na Tabela 8. Verifica-se que o método utilizando a derivada não altera os parâmetros de confiabilidade analítica[3].

Tabela 8- Comparação dos parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação dos antioxidantes utilizando-se a espectrofotometria de ordem zero e derivativa de primeira ordem.

	LD/(mol L ⁻¹)	LQ/(mol L ⁻¹)	Faixa Linear
BHA D ⁰	1,82x10 ⁻⁵	4,72x10 ⁻⁵	1,66x10 ⁻⁵ a 2,77x10 ⁻⁴
BHA D ¹	2,53x10 ⁻⁵	6,67x10 ⁻⁵	5,55x10 ⁻⁵ a 3,33x10 ⁻⁴
BHT D ⁰	3,68x10 ⁻⁵	8,04x10 ⁻⁵	2,27x10 ⁻⁵ a 5,44x10 ⁻⁴
BHT D ¹	4,77x10 ⁻⁵	1,44x10 ⁻⁴	9,08x10 ⁻⁵ a 5,44x10 ⁻⁴

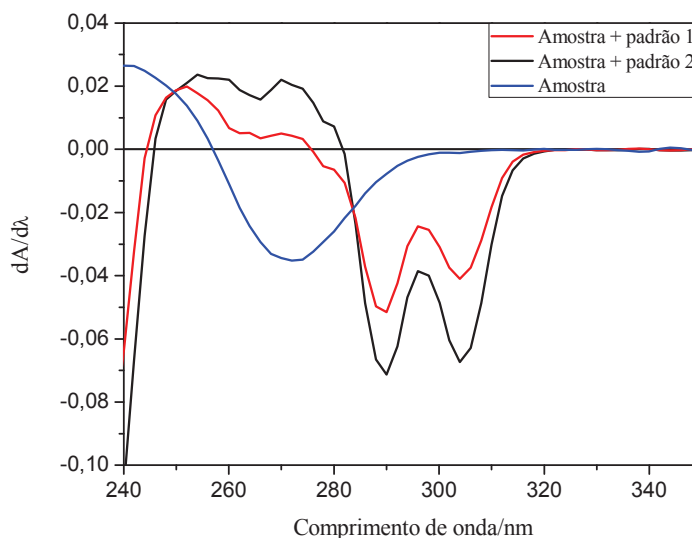
D⁰: ordem zero;
D¹: primeira ordem.

4.1.3 Estudo de recuperação de BHA e BHT em amostras de maionese e molho de salada

A porcentagem de recuperação dos analitos nas amostras foi obtida comparando-se a resposta da solução na qual se adicionou a solução padrão com o sinal analítico da solução de amostra sem a adição de padrão. O valor da recuperação obtida é um indicativo da exatidão do procedimento, uma vez que coloca o analito em contato com as substâncias existentes na mistura de amostra, avaliando sua interferência na resposta do procedimento.

Os espectros de absorção do estudo de recuperação dos antioxidantes em uma amostra de maionese são apresentados na Figura 13.

Figura 13- Espectros da primeira derivada para os ensaios de recuperação de uma amostra de maionese.



*padrão 1= mistura dos padrões de BHA e BHT nas concentrações: BHA $1,66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e BHT $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. *Padrão 2= mistura dos padrões de BHA e BHT nas concentrações: BHA $2,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e BHT $3,63 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Verifica-se nos espectros da Figura 13 a contribuição da absorção das espécies químicas das soluções de referência do BHT e do BHA, que apresentam absorção máxima nos λ de 290 e 305 nm respectivamente. A contribuição destas substâncias é visível no espectro da solução de amostra de maionese que não apresenta elevada absorção nos λ de interesse dos analitos.

O estudo da recuperação dos antioxidantes foi realizado adicionando-se alíquotas de solução de referência, mistura binária de BHA e de BHT às amostras, obtendo-se assim duas concentrações finais de aproximadamente $1,66 \times 10^{-4}$ e $2,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para o BHA e $2,72 \times 10^{-4}$ e $3,63 \times 10^{-4}$ para o BHT. Os resultados de recuperação estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, sendo estabelecida como hipótese nula (H_0): Rec = 100% e como hipótese alternativa (H_1): Rec. \neq 100% (teste bilateral). O teste t aplicado, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado.

Tabela 9- Resultados dos ensaios de recuperação da determinação de BHA, utilizando a primeira derivada.

Amostra	BHA / mol L ⁻¹		Recuperação / %	t (calculado)
	Adicionado	Encontrado		
Maionese A	1,66x10 ⁻⁴	1,63x10 ⁻⁴ ±1,65x10 ⁻⁵	97,9	1,1136
	2,22x10 ⁻⁴	2,69x10 ⁻⁴ ±1,70x10 ⁻⁵	121	
Maionese B	1,66x10 ⁻⁴	1,80x10 ⁻⁴ ±1,17x10 ⁻⁵	108	
	2,22x10 ⁻⁴	2,66x10 ⁻⁴ ±6,90x10 ⁻⁷	119	
Molho emulsionado	1,66x10 ⁻⁴	1,58x10 ⁻⁴ ±1,81x10 ⁻⁶	95,4	
	2,22x10 ⁻⁴	2,45x10 ⁻⁴ ±3,48 x10 ⁻⁵	110	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 4,30 (95%)

Tabela 10- Resultados dos ensaios de recuperação da determinação de BHT, utilizando a primeira derivada.

Amostra	BHT / mol L ⁻¹		Recuperação / %	t (calculado)
	Adicionado	Encontrado		
Maionese A	2,72x10 ⁻⁴	2,55x10 ⁻⁴ ±7,13x10 ⁻⁶	93,7	-0,930
	3,63x10 ⁻⁴	3,85x10 ⁻⁴ ±1,53x10 ⁻⁵	105	
Maionese B	2,72x10 ⁻⁴	2,56x10 ⁻⁴ ±1,55x10 ⁻⁵	94,2	
	3,63x10 ⁻⁴	3,76x10 ⁻⁴ ±8,20x10 ⁻⁶	103	
Molho emulsionado	2,72x10 ⁻⁴	2,59x10 ⁻⁴ ±6,56x10 ⁻⁶	95,2	
	3,63x10 ⁻⁴	3,76x10 ⁻⁴ ±9,41 x10 ⁻⁶	103	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 4,30 (95%)

Os resultados do ensaio de exatidão, realizado em dois níveis de concentração, utilizando amostras de maionese e molho de salada (Tabelas 9 e 10), revelaram que praticamente todas as amostras apresentaram recuperações dentro da faixa estabelecida pela ANVISA (80,0-120%)[83]. Os valores de recuperação que variaram de 95,4 a 121% para o BHA e de 93,7 a 105% para o BHT comprovam a exatidão do método proposto.

Ainda, a recuperação média não foi estatisticamente diferente de 100% ao nível de confiança de 95% ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$).

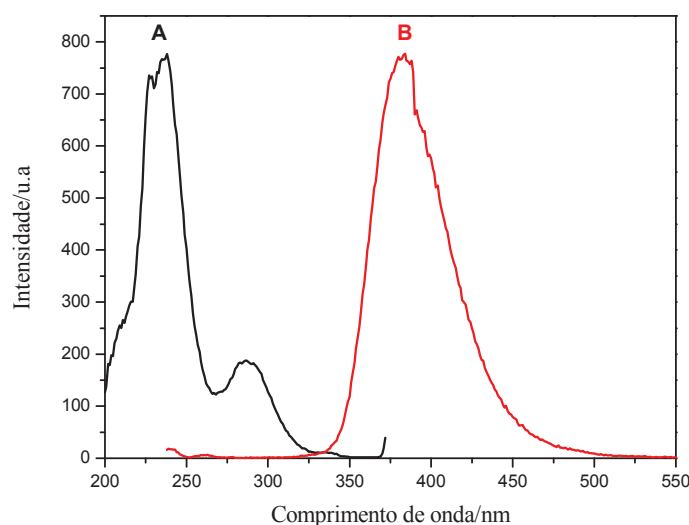
A grande vantagem da utilização da espectrofotometria de derivadas está relacionada com a possibilidade de quantificar dois ou mais componentes com sobreposição de sinal, sem complicados procedimentos de separação ou extração prévios, bem como não necessitar de padrões ultrapuros exigidos na cromatografia líquida de alta eficiência, além da grande possibilidade da validação do método no doseamento simultâneo, aliada ao baixo preço[3].

4.2 Espectrofluorimetria para determinação de Cetoconazol em água de rio e formulações farmacêuticas

4.2.1 Espectros de excitação e emissão

Inicialmente obteve-se um espectro de emissão e de excitação de uma solução padrão de CTZ $7,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução tampão pH 9,00, apresentado na Figura 14, para verificar os comprimentos de onda de excitação e emissão do analito. O CTZ mostra fluorescência nativa com um máximo de excitação em $\lambda_{\text{ex}} = 237$ nm e um máximo de emissão em $\lambda_{\text{em}} = 383$ nm.

Figura 14- Espectro de (a) excitação e (b) emissão do Cetoconazol $7,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em pH 9,00. ($\lambda_{\text{ex}} = 237$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 383$ nm); módulo alto.

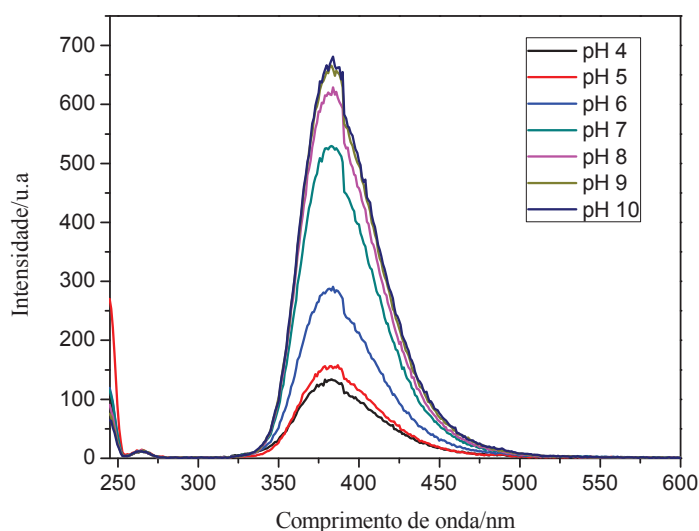


4.2.2 Efeito do pH do meio sobre a intensidade de emissão

Um dos parâmetros críticos a serem observados durante a determinação de analitos orgânicos, incluindo fármacos, é o que se refere ao pH da amostra pois, em muitos casos, o pH do meio determina a espécie química do analito em solução e, conseqüentemente, interfere na eficiência da extração ou processos de transferência eletrônica. Além disso, é imprescindível escolher uma faixa de pH onde também não ocorra degradação dos analitos[37].

A influência do pH sobre a intensidade de emissão do sistema foi estudada utilizando uma mesma concentração do analito ($7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes soluções tampão ao longo da faixa de 4,00 a 10,0 a fim de estabelecer o valor de pH que permita o maior sinal analítico. É possível observar na Figura 15 que os espectros não apresentaram deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão, permanecendo em 383 nm. A medida que variou-se o pH do meio, fato que demonstra que as soluções tampão utilizadas não tiveram efeito de interferência sobre a determinação do CTZ ao avaliar seu espectro de emissão. A intensidade de fluorescência é máxima a cerca de 670 nm para pH 9,00 e 10,0.

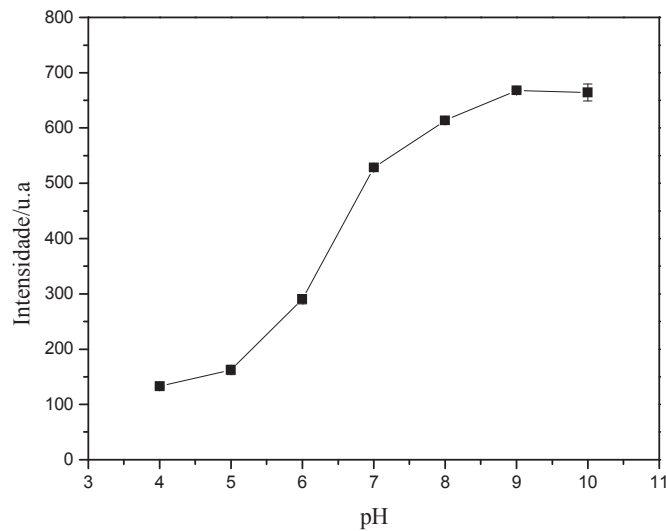
Figura 15- Espectro de emissão de Cetoconazol $7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.



O efeito do pH do meio sobre a intensidade de emissão pode ser verificado na Figura 16. Com o aumento do pH observa-se uma variação correspondente da intensidade de emissão, que permaneceu praticamente constante para pH 9,00 e 10,0. Portanto, um valor

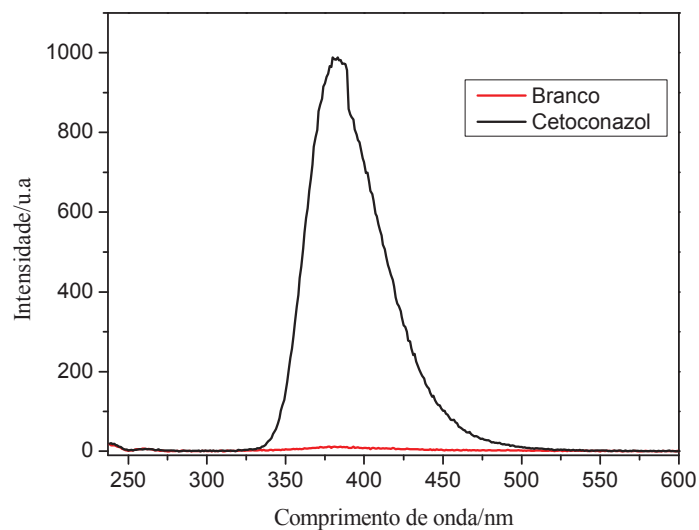
de pH 9,00 foi fixado utilizando solução tampão (mistura das soluções de KCl 0,10 mol L⁻¹ e solução de ácido bórico 0,10 mol L⁻¹) para todas as análises subsequentes.

Figura 16- Influência do pH na intensidade de emissão do Cetoconazol 7,00x10⁻⁶ mol L⁻¹. ($\lambda_{\text{ex}} = 237$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 383$ nm); módulo alto.



Observa-se na Figura 17 que a solução tampão escolhida não apresenta fluorescência, portanto não interfere na determinação do CTZ utilizando o método proposto.

Figura 17- Espectro de emissão de Cetoconazol 1,00x10⁻⁵ mol L⁻¹ em pH 9,00 e do branco (solução tampão pH 9,00). ($\lambda_{\text{ex}} = 237$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 383$ nm); módulo alto.



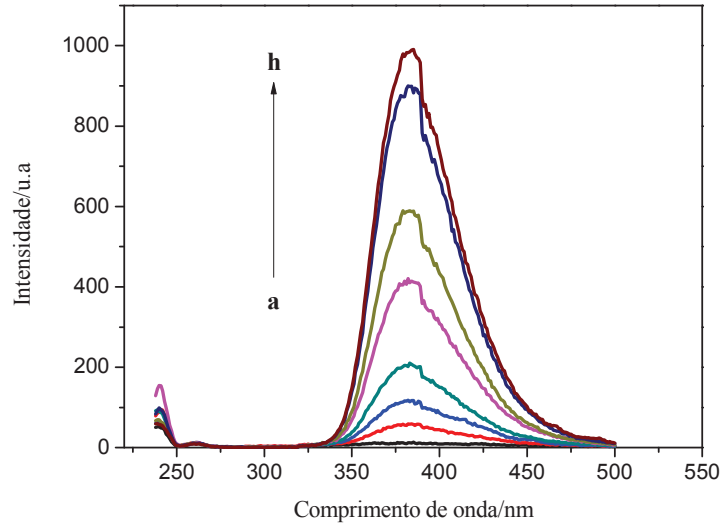
O espectrofluorímetro usado apresenta dois estados para calibração, um deles o mais sensível é denominado módulo alto e o outro menos sensível, módulo baixo. A calibração e seleção dos módulos é feita utilizando um padrão de Rodamina. A diferença entre o módulo alto e baixo é apenas a sensibilidade. O módulo alto detecta uma intensidade de fluorescência cerca de 3 vezes maior que o módulo baixo, utilizando uma mesma amostra (mesma concentração). Com o objetivo de determinar qual dos dois módulos seria mais adequado para determinação de CTZ, realizou-se curvas analíticas e testes de adição e recuperação nos dois módulos, mostrados a seguir.

4.2.3 Parâmetros analíticos de espectrofluorimetria para a determinação de Cetoconazol utilizando o “módulo alto” do equipamento

A curva analítica foi obtida a partir de leituras sucessivas em duplicata de soluções de referência de CTZ, preparadas diariamente em solução tampão pH 9,00.

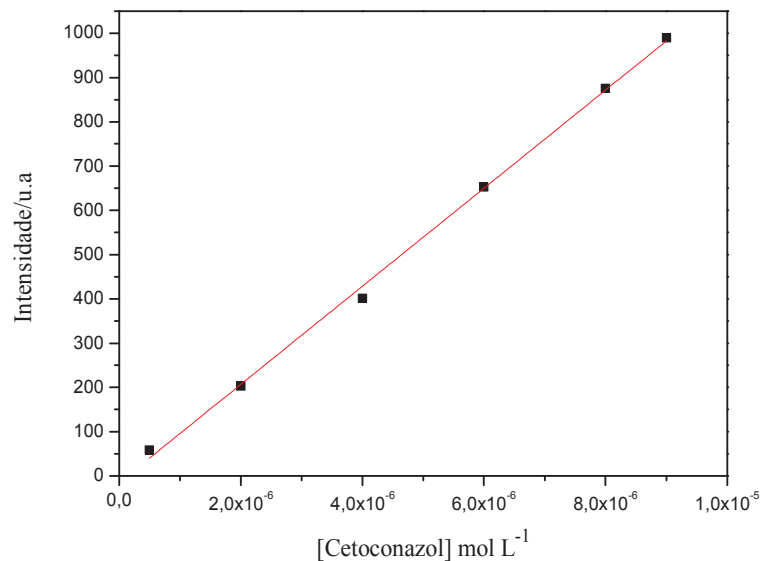
Sob as condições otimizadas, obteve-se uma curva analítica que apresentou relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração de CTZ no intervalo de $5,00 \times 10^{-7}$ a $9,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,26 a 4,78 µg mL⁻¹). A equação de regressão linear da curva de calibração obtida foi $I = 1,09 \times 10^8 \times C_{CTZ} + 3,24$; onde I é a intensidade de emissão (u.a) e C_{CTZ} a concentração de Cetoconazol em mol L⁻¹, com um coeficiente de regressão linear de 0,9997. Os espectros de emissão das oito soluções padrão de CTZ estão apresentados na Figura 18.

Figura 18- Espectro de emissão das soluções da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{ex} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 383 \text{ nm}$); módulo alto. (a) $1,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (g) $8,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (h) $9,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



A Figura 18 mostra os espectros da curva analítica para a determinação de CTZ. A intensidade de fluorescência é proporcional a concentração e não há deslocamento do λ de emissão (λ_{em}). A Figura 19 mostra o gráfico da curva analítica para a determinação de BFA, demonstrando que a intensidade de fluorescência é proporcional a concentração.

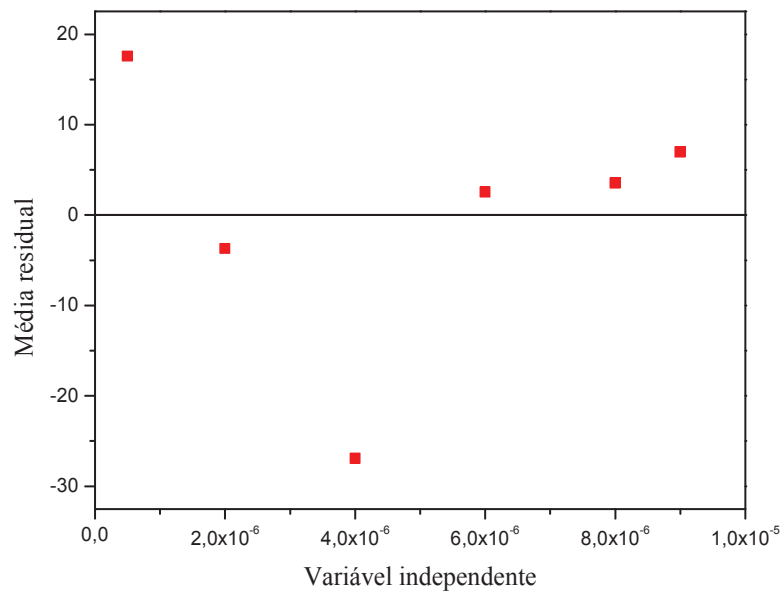
Figura 19- Curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{ex} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.



Obteve-se gráfico dos resíduos da curva analítica. A avaliação dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade presença de amostras atípicas, heterocedastidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedastidade), e ausência de amostras atípicas[37].

Observa-se na Figura 20 que o gráfico de resíduos mostra uma distribuição aleatória dos pontos ao redor da reta de regressão descrita pela equação da curva analítica, o que é desejado para uma curva de calibração com boa linearidade.

Figura 20- Gráfico de resíduo dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{ex} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 383 \text{ nm}$); módulo alto.



A análise de variância também foi realizada com os dados da curva analítica do CTZ ao utilizar o procedimento espectrofluorimétrico proposto. A variância permite avaliar a significância da regressão. Como mostrado na Tabela 11, o elevado valor de F (6216,47) indica a existência de uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração, pois o $F_{calculado}$ foi maior que o recomendado (2,77).

Tabela 11- Análise de variância da curva analítica para determinação de Cetoconazol; (módulo alto).

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	$5,86 \times 10^4$	$5,86 \times 10^4$	6216,47	$1,55 \times 10^{-7}$
Resíduo	4	37,68	9,42		
Total	5	$5,86 \times 10^4$			

O limite de detecção foi determinado a partir de 10 medidas do branco do procedimento, obtendo-se a média e o desvio padrão desse conjunto de medidas. O limite de detecção foi calculado ($3 \times$ desvio padrão do erro do intercepto + intercepto / inclinação da curva analítica), e de modo semelhante, estimou-se o limite de quantificação ($10 \times$ desvio padrão do erro do intercepto + intercepto / inclinação da curva analítica).

O limite de detecção e quantificação calculados foram de $1,05 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,055 µg mL⁻¹) e $2,81 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,149 µg mL⁻¹), respectivamente.

A Tabela 12 apresenta as equações das curvas de calibração para determinação de CTZ e os seus respectivos coeficientes de regressão. As inclinações das curvas analíticas avaliadas indicam uma boa sensibilidade do método espectrofluorimétrico. Verifica-se linearidade adequada dentro da faixa de concentração estudada com os coeficientes de regressão maiores que 0,99[83, 84].

As curvas analíticas foram construídas em um intervalo de 24 horas e de sete a trinta dias entre as análises, com o objetivo de avaliar as inclinações das regressões lineares entre os dias. O DPR dos coeficientes angulares foi de 9,33%, mostrando reprodutibilidade adequada na obtenção das curvas analíticas.

Tabela 12- Equações das curvas analíticas para determinação do Cetoconazol em diferentes dias; (módulo alto).

Equação da curva analítica	r
$I = 1,11 \times 10^8 (\pm 2,97 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 112 (\pm 13,0)$	0,998
$I = 1,09 \times 10^8 (\pm 2,03 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 3,07 (\pm 3,71)$	0,999
$I = 1,09 \times 10^8 (\pm 1,38 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 3,24 (\pm 2,75)$	0,999
$I = 9,02 \times 10^7 (\pm 4,18 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 197 (\pm 24,0)$	0,996

C_{CTZ} = Concentração de Cetoconazol em mol L⁻¹

4.2.4 Teste de adição e recuperação do Cetoconazol em água de rio

No teste de recuperação do analito, quatro concentrações diferentes de solução de referência de CTZ ($1,00 \times 10^{-6}$; $2,00 \times 10^{-6}$; $4,00 \times 10^{-6}$ e $6,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram adicionadas a soluções de amostras de água de rio e foi realizado a determinação de CTZ utilizando o procedimento proposto. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados.

Foram avaliadas três amostras de água de rio (pontos B, C e D) os resultados estão apresentados na Tabela 13. Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, avaliando-se a recuperação média na faixa estudada. Estabeleceu-se como hipótese nula (H_0): $Rec = 100\%$ e como hipótese alternativa (H_1): $Rec. \neq 100\%$ (teste bilateral).

Os valores de recuperação para as amostras de rio variaram de 63,6 a 104%. Podemos verificar a influência da matriz da amostra devido ao baixo valor de recuperação, 63,6% abaixo da faixa estabelecida de 80 a 120% [83, 84, 85], apenas na primeira adição de padrão do ponto C. Exceto para esta única amostra, o ensaio de recuperação das amostras de água indicam uma boa exatidão do método proposto. Ainda, a recuperação média não foi estatisticamente diferente de 100% ao nível de confiança de 95% ($t_{calculado} < t_{tabelado}$).

Tabela 13- Ensaio de recuperação para a determinação de Cetoconazol em amostras de rio; (módulo alto).

Amostra	Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação %	t (calculado)
	Adicionado	Encontrado		
Ponto B	1,00x10 ⁻⁶	9,27x10 ⁻⁷ ± 1,25x10 ⁻⁸	92,7	
	2,00x10 ⁻⁶	2,08x10 ⁻⁶ ± 1,60x10 ⁻⁸	104	
	4,00x10 ⁻⁶	3,34x10 ⁻⁶ ± 6,44x10 ⁻⁸	83,4	-0,49
	6,00x10 ⁻⁶	5,46x10 ⁻⁶ ± 3,39x10 ⁻⁷	91,0	
Ponto C	1,00x10 ⁻⁶	6,36x10 ⁻⁷ ± 1,76x10 ⁻⁷	63,6	
	2,00x10 ⁻⁶	1,88x10 ⁻⁶ ± 2,78x10 ⁻⁸	94,2	
	4,00x10 ⁻⁶	3,90x10 ⁻⁶ ± 8,89x10 ⁻⁸	97,7	-0,33
	6,00x10 ⁻⁶	6,19x10 ⁻⁶ ± 2,02 x10 ⁻⁷	103	
Ponto D	1,00x10 ⁻⁶	9,37x10 ⁻⁷ ± 1,91x10 ⁻⁸	93,7	
	2,00x10 ⁻⁶	1,69x10 ⁻⁶ ± 7,12x10 ⁻⁸	84,5	
	4,00x10 ⁻⁶	3,62x10 ⁻⁶ ± 5,63x10 ⁻⁸	90,4	-0,70
	6,00x10 ⁻⁶	5,99x10 ⁻⁶ ± 6,18 x10 ⁻⁸	99,9	

média ± desvio padrão; n=3; t tabelado= 3,18 (95%)

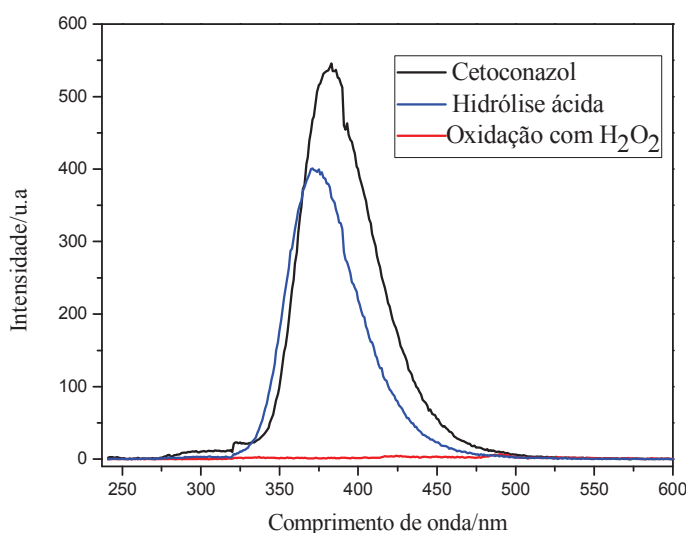
4.2.5 Efeito dos interferentes produzidos pela hidrólise ácida e oxidação sob a intensidade de emissão do Cetoconazol

Produtos farmacêuticos estão sujeitos à degradação química, fato que pode diminuir sua eficácia como medicamento ou até ocorrer a formação de produtos indesejáveis. O CTZ pode sofrer degradação, incluindo reações de oxidação e hidrólise. Por isso, avaliou-se o efeito que esses compostos podem causar na determinação do analito por espectrofluorimetria.

Foram avaliados o efeito dos produtos de degradação sobre a determinação do CTZ de duas formas: hidrólise ácida e oxidação com peróxido de hidrogênio.

A Figura 21 mostra os espectros de emissão das soluções de CTZ puro e obtidos com a hidrólise ácida e oxidação com peróxido de hidrogênio (contendo os produtos de degradação). A banda original do espectro de emissão do CTZ (383 nm) é deslocada para λ menores (370 nm) depois que a solução de CTZ foi submetida a hidrólise ácida. Entretanto, não há uma banda para a oxidação do CTZ, apenas uma baixíssima intensidade de fluorescência.

Figura 21- Espectro de emissão dos produtos de degradação do Cetoconazol $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em HCl 0,10 mol L⁻¹. ($\lambda_{\text{ex}} = 237$ nm); módulo alto.

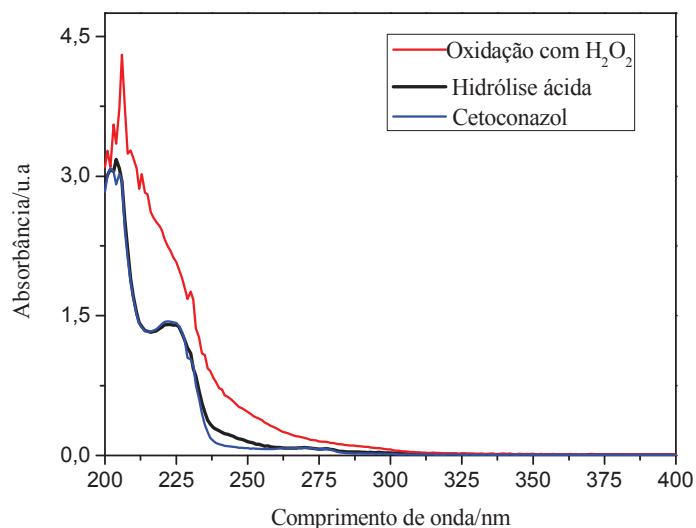


Os espectros de emissão mostram uma diminuição da intensidade de fluorescência dos produtos de degradação quando comparados ao espectro do CTZ original (sem degradação). Enquanto o CTZ apresenta 542 u.a. de intensidade de fluorescência, após a hidrólise ácida passou a 399 u.a. e após a oxidação, 1 u.a. Indicando pequena extensão da degradação do CTZ pela hidrólise ácida, porém uma degradação quase total pela oxidação com H₂O₂.

Os espectros de absorção molecular dos produtos de degradação também foram obtidos. Observa-se na Figura 22 uma banda de absorção para o CTZ em 223 nm. O espectro referente à hidrólise ácida não demonstra diferença do espectro de absorção do CTZ original. Verifica-se um aumento no ombro dos espectros entre 237 nm e 250 nm, provavelmente devido a formação de uma pequena concentração de produtos de degradação. Esta pequena quantidade formada poderia absorver a radiação emitida pelo CTZ, como verificado na Figura 21. Já o espectro dos produtos de oxidação, não tem uma banda definida, além de elevado ruído, o que impossibilita confirmar a existência de CTZ

neste produto previamente oxidado com H_2O_2 . A forma do espectro provavelmente origina-se por um excesso de H_2O_2 remanescente em solução.

Figura 22- Espectro de absorção dos produtos de degradação do Cetoconazol $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.



Verificou-se ainda o comportamento dos produtos de degradação quanto as suas matrizes de excitação e emissão. Estes espectros de fluorescência na forma tridimensional foram obtidos em solução tampão pH 9,00 para verificar se ocorreu alteração nos comprimentos de onda de excitação e emissão do analito. O CTZ apresenta $\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$ originalmente (Figura 23). Não se observou alteração do espectro de matriz de excitação e emissão por hidrólise ácida (Figura 24). Entretanto, houve mudança na matriz a partir da oxidação com H_2O_2 no qual aparecem duas bandas $\lambda_{\text{ex}} = 290 / \lambda_{\text{em}} = 325$ e $\lambda_{\text{ex}} = 325 / \lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ (Figura 25).

Os espectros de matriz de excitação e emissão confirmam o que foi observado nos espectros de absorção e de emissão. A hidrólise ácida causou uma pequena degradação do CTZ enquanto que a oxidação com H_2O_2 degradou totalmente o analito.

Figura 23- Matriz de excitação e emissão de Cetoconazol $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).

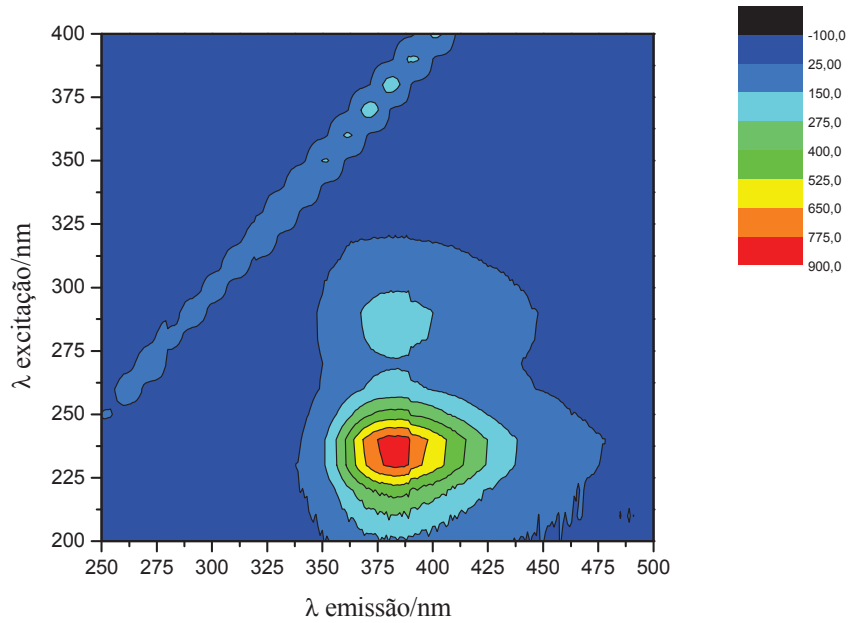


Figura 24- Matriz de excitação e emissão do produto de degradação do Cetoconazol por hidrólise ácida; concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).

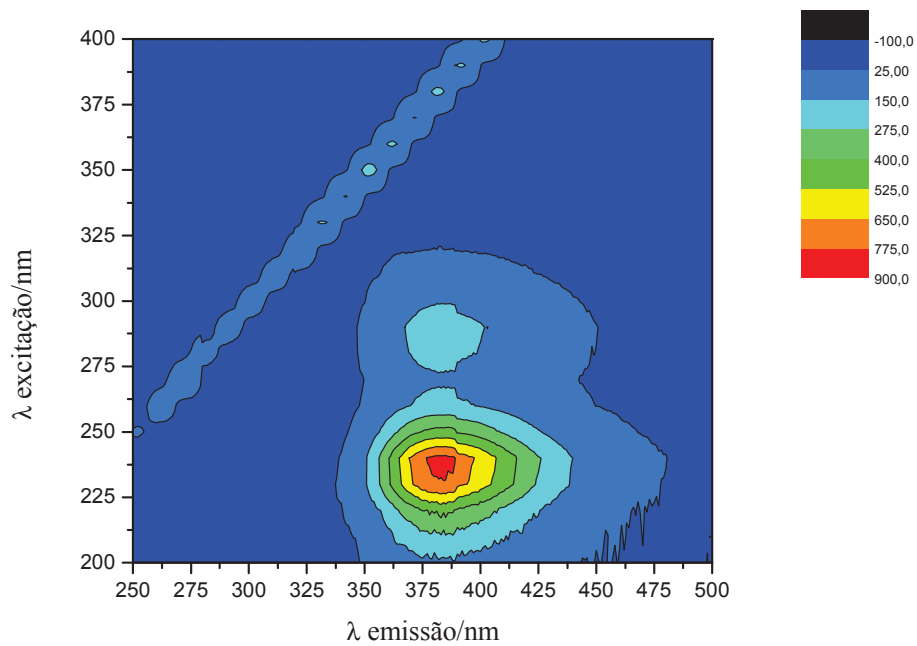
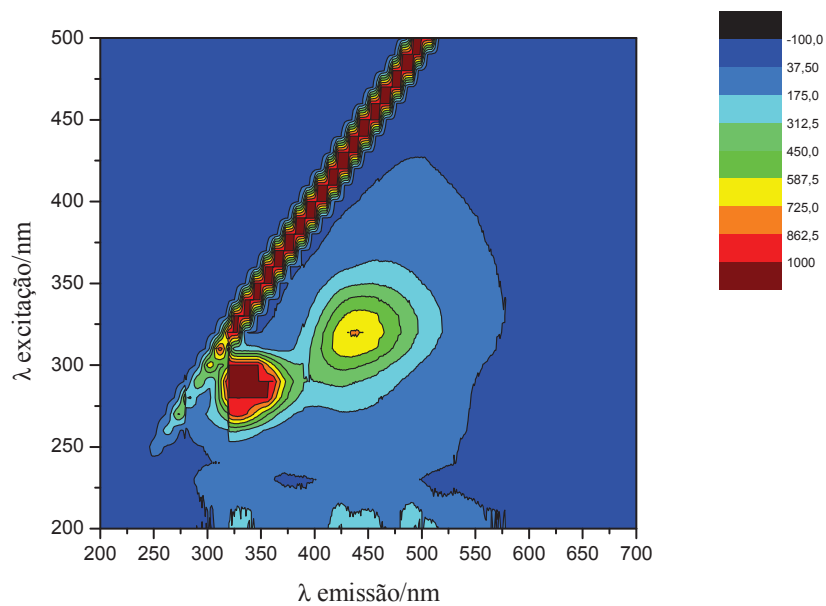


Figura 25- Matriz de excitação e emissão do produto de oxidação do Cetoconazol por adição de H_2O_2 , concentração de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão pH 9,00; (módulo alto).



Avaliando o espectro da Figura 25, verifica-se que não houve a mineralização do CTZ adicionado. Observa-se o deslocamento dos λ de excitação do CTZ de 237 nm para 290 nm, assim como o deslocamento do λ de emissão para 325 nm. Ainda, aparece uma segunda banda intensa em λ_{em} em 445 nm e λ_{ex} em 325 nm .

O efeito dos produtos da hidrólise e oxidação sobre a intensidade de emissão foi estimado, avaliando-se a recuperação de uma solução padrão de CTZ em uma solução contendo um teor dos referidos produtos (Tabela 14).

Tabela 14- Estudo de recuperação para avaliar a interferência dos produtos de degradação na determinação de CTZ. (módulo baixo).

Amostra	Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação/%	t _{calculado}
	Adicionado	Encontrado		
Hidrólise ácida	2,00x10 ⁻⁶	2,12x10 ⁻⁶ ±8,07x10 ⁻⁷	106	-0,280
	6,00x10 ⁻⁶	6,02x10 ⁻⁶ ±1,36x10 ⁻⁷	100	
	1,00x10 ⁻⁵	7,09x10 ⁻⁶ ±5,83 x10 ⁻⁸	71,0	
Oxidação com H ₂ O ₂	2,00x10 ⁻⁶	1,79x10 ⁻⁶ ±7,20x10 ⁻⁸	89,7	-2,08
	6,00x10 ⁻⁶	4,85x10 ⁻⁶ ±1,67x10 ⁻⁷	80,8	
	1,00x10 ⁻⁵	7,90x10 ⁻⁶ ±1,77 x10 ⁻⁷	79,0	

média ± desvio padrão; n=3; t_{tabelado}= 3,18 (95%).

No caso da degradação por hidrólise ácida, não houve interferência para as adições de 2,00x10⁻⁶ mol L⁻¹ e 6,00x10⁻⁶ mol L⁻¹. Uma interferência foi verificada na adição de 1,00x10⁻⁵ mol L⁻¹. Os valores de recuperação para hidrólise ácida variaram de 71,0 a 106%. Quanto à degradação por oxidação com H₂O₂ a recuperação variou de 79,0 a 89,7% de CTZ adicionado, indicando interferência dos produtos de hidrólise na determinação de CTZ. Entretanto, avalia-se que o procedimento apresenta exatidão adequada, pois a concentração dos produtos degradados é maior que aquelas que podem ser encontradas nas formulações farmacêuticas.

4.2.6 Fotodegradação do Cetoconazol com radiação UV

Verificou-se o efeito da radiação eletromagnética na região UV sobre a determinação de CTZ empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto. O analito na forma de pó foi irradiado durante 24 horas por uma lâmpada de vapor de mercúrio. Após este tempo, o pó que era branco mudou de cor, tornou-se alaranjado, apenas na superfície. A mudança de coloração, a princípio, era indicativo de uma degradação superficial.

Posteriormente homogeneizou-se e preparou-se uma solução com este produto formado após a radiação UV. A fim de verificar seu comportamento, espectros de matriz de excitação e emissão e também espectros de absorção molecular antes e após a radiação foram realizados.

Ao visualizar os espectros observa-se que não houve alteração do espectro de absorção (Figura 27), nem dos λ de excitação e emissão, que ficaram inalterados (λ_{ex} = 237 nm e λ_{em} = 383 nm) apresentados na Figura 28. O que indica que não houve formação de um ou mais fotoprodutos do CTZ após a exposição por radiação UV.

Figura 26- Espectro de absorção da solução de Cetoconazol padrão e Cetoconazol exposto a radiação UV; Concentração de $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

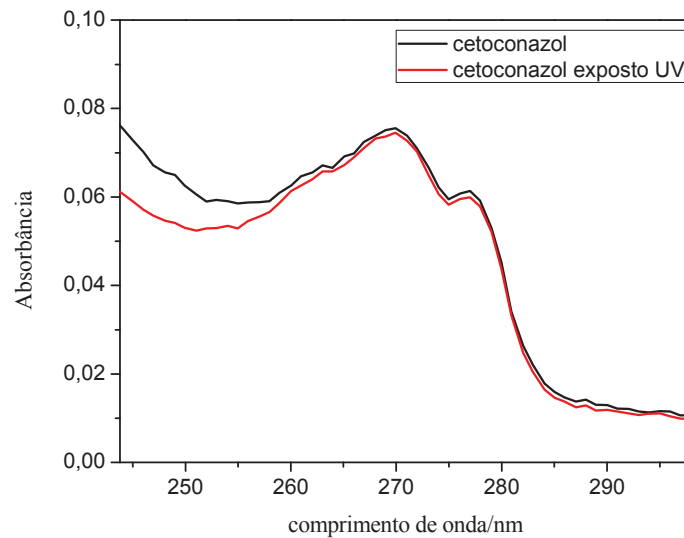
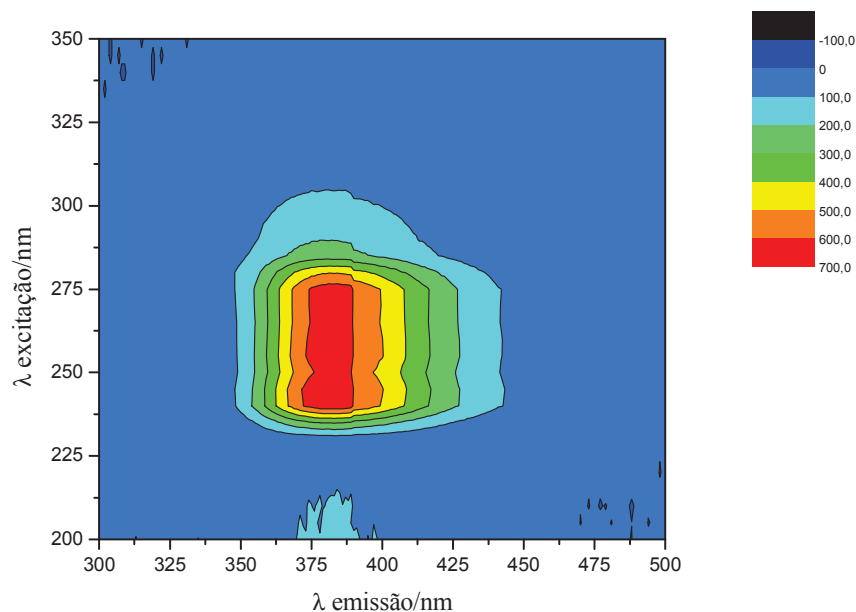


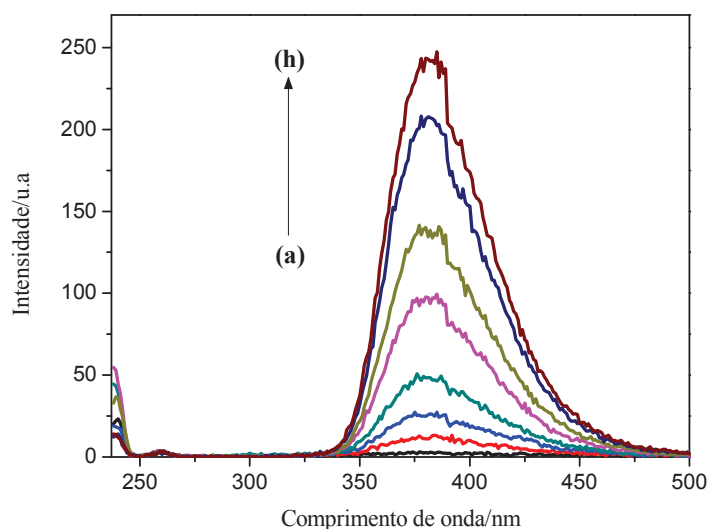
Figura 27- Matriz de excitação e emissão de Cetoconazol $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ exposto a radiação UV em HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (módulo alto).



4.2.7 Parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação de Cetoconazol

A curva analítica foi obtida a partir leituras em duplicata de soluções de referência de CTZ, preparadas diariamente em solução tampão pH 9,00. Sob as condições otimizadas, obteve-se uma curva analítica na qual se verificou uma relação linear entre a intensidade de emissão da fluorescência e a concentração de CTZ no intervalo de $5,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (0,26 a 5,31 µg mL⁻¹). A curva analítica pode ser descrita pela equação $I = 2,30 \times 10^7 \times C_{CTZ} + 0,232$; I é a intensidade de emissão (u.a) e C_{CTZ} a concentração de Cetoconazol em mol L⁻¹, com um coeficiente de regressão linear de 0,9993. Os espectros de emissão das soluções padrão em oito concentrações de CTZ são apresentados na Figura 29, observa-se que não há deslocamento do λ de emissão.

Figura 28- Espectro de emissão da curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{ex} = 237$ nm; $\lambda_{em} = 383$ nm); módulo baixo. (a) $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (b) $5,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (c) $1,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (d) $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (e) $4,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (f) $6,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (g) $8,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (h) $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



A Figura 29 mostra a curva analítica para a determinação de CTZ. A intensidade de fluorescência é proporcional a concentração.

A Figura 29 apresenta o gráfico de resíduos dos dados da curva analítica. Podemos observar que o gráfico mostra uma distribuição aleatória dos pontos ao redor da reta de regressão, com um aumento do resíduo com o aumento da concentração de CTZ.

Figura 29- Curva analítica para a determinação de Cetoconazol em pH 9,00. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo baixo.

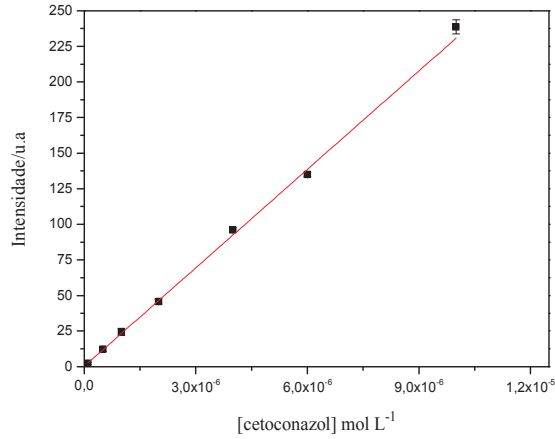
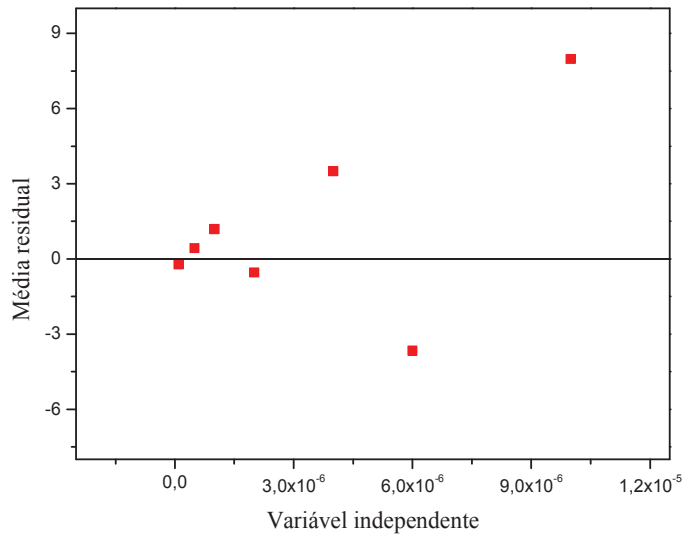


Figura 30- Gráfico de resíduos dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de CTZ em pH 9,00. ($\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$); módulo baixo.



A análise de variância foi realizada com os dados da curva analítica do CTZ obtidos com o procedimento espectrofluorimétrico proposto. A variância permite avaliar a significância da regressão. Como mostrado na Tabela 15, o elevado valor de F (3.698,21) indica a existência de uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o recomendado (2,57).

Tabela 15- Análise de variância da curva analítica para determinação de Cetoconazol. (módulo baixo).

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	8450,49	8450,49	3698,21	$2,27 \times 10^{-8}$
Resíduo	5	11,42	2,28		
Total	6	8461,91			

O limite de detecção foi determinado a partir de 10 medidas do branco do procedimento, obtendo-se a média e o desvio padrão desse conjunto de medidas. O limite de detecção foi calculado ($3 \times$ desvio padrão do erro do intercepto + intercepto / inclinação da curva analítica), e de modo semelhante, estimou-se o limite de quantificação ($10 \times$ desvio padrão do erro do intercepto + intercepto / inclinação da curva analítica).

Um limite de detecção e limite de quantificação de $1,36 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,072 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e $3,72 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,197 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foram obtidos respectivamente.

A Tabela 16 apresenta as equações das curvas de calibração do CTZ e os seus respectivos coeficientes de regressão. As inclinações das curvas analíticas avaliadas indicam uma boa sensibilidade do método espectrofluorimétrico. Além de boa linearidade dentro da faixa de concentração estudada com coeficientes de regressão maiores que 0,99[83, 84].

Respeitou-se um intervalo de 24 horas e de sete a trinta dias entre as análises para construção das curvas analíticas, com o objetivo de avaliar as inclinações das regressões lineares entre os dias. Na Tabela 16 verificamos um DPR dos coeficientes angulares de 9,00%, mostrando reprodutibilidade adequada do procedimento analítico proposto.

Tabela 16- Equações das curvas analíticas para determinação do Cetoconazol em diferentes dias; (módulo baixo).

Equação da curva analítica	r
$I = 2,73 \times 10^7 (\pm 6,59 \times 10^5) \times C_{\text{CTZ}} + 7,29 (\pm 3,71)$	0,998
$I = 2,30 \times 10^7 (\pm 3,79 \times 10^5) \times C_{\text{CTZ}} + 0,23 (\pm 0,97)$	0,999
$I = 2,41 \times 10^7 (\pm 4,23 \times 10^5) \times C_{\text{CTZ}} - 1,09 (\pm 1,02)$	0,999

I = Intensidade de emissão (UA); C_{CTZ} = Concentração de cetoconazol (mol L^{-1})

4.2.8 Avaliação da recuperação do Cetoconazol em formulações farmacêuticas e água de rio

No teste de recuperação do analito, quatro concentrações diferentes de solução padrão de CTZ ($2,00 \times 10^{-6}$, $4,00 \times 10^{-6}$, $6,00 \times 10^{-6}$ e $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram adicionadas às soluções de amostras (farmacêuticas e de água de rio) e os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados.

Foram avaliadas três amostras de água de rio (pontos B, C e D) e três amostras farmacêuticas (comprimido A, B e C). Os resultados das recuperações estão apresentados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17- Recuperação de cetoconazol em amostras de água de rio; (módulo baixo).

Amostra	Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação %	t calculado
	Adicionado	Encontrado		
Ponto B	$2,00 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-6} \pm 2,98 \times 10^{-8}$	108	0,69
	$4,00 \times 10^{-6}$	$4,07 \times 10^{-6} \pm 1,16 \times 10^{-8}$	102	
	$6,00 \times 10^{-6}$	$6,04 \times 10^{-6} \pm 5,15 \times 10^{-7}$	101	
	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-5} \pm 1,79 \times 10^{-7}$	108	
Ponto C	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,64 \times 10^{-6} \pm 1,07 \times 10^{-7}$	82,2	-0,52
	$4,00 \times 10^{-6}$	$3,90 \times 10^{-6} \pm 2,71 \times 10^{-7}$	97,5	
	$6,00 \times 10^{-6}$	$5,86 \times 10^{-6} \pm 2,18 \times 10^{-8}$	97,6	
	$1,00 \times 10^{-5}$	$9,58 \times 10^{-6} \pm 1,55 \times 10^{-7}$	95,8	
Ponto D	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,51 \times 10^{-6} \pm 8,91 \times 10^{-8}$	75,6	-0,21
	$4,00 \times 10^{-6}$	$3,55 \times 10^{-6} \pm 7,24 \times 10^{-9}$	88,8	
	$6,00 \times 10^{-6}$	$6,45 \times 10^{-6} \pm 2,35 \times 10^{-7}$	107	
	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-5} \pm 1,20 \times 10^{-7}$	105	

média \pm desvio padrão; n=3; t tabelado= 3,18 (95%).

Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, sendo estabelecida como hipótese nula (H_0): Rec = 100% e como hipótese alternativa (H_1): Rec. \neq 100% (teste bilateral). O teste t aplicado, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado.

Tabela 18- Recuperação de cetoconazol em comprimidos; (módulo baixo).

Amostra	Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação %	t calculado
	Adicionado	Encontrado		
A	2,00x10 ⁻⁶	1,95x10 ⁻⁶ ±1,00x10 ⁻⁷	97,5	-2,60
	4,00x10 ⁻⁶	3,60x10 ⁻⁶ ±1,82x10 ⁻⁸	89,9	
	6,00x10 ⁻⁶	5,24x10 ⁻⁶ ±1,44x10 ⁻⁷	87,3	
	1,00x10 ⁻⁵	7,86x10 ⁻⁶ ±1,87 x10 ⁻⁷	78,6	
B	2,00x10 ⁻⁶	1,97x10 ⁻⁶ ±1,52x10 ⁻⁸	98,5	-2,46
	4,00x10 ⁻⁶	3,52x10 ⁻⁶ ±5,04x10 ⁻⁸	88,1	
	6,00x10 ⁻⁶	4,92x10 ⁻⁶ ±5,42x10 ⁻⁸	81,9	
	1,00x10 ⁻⁵	7,52x10 ⁻⁶ ±2,67 x10 ⁻⁸	75,2	
C	2,00x10 ⁻⁶	1,94x10 ⁻⁶ ±3,92x10 ⁻¹⁰	96,9	-3,10
	4,00x10 ⁻⁶	3,36x10 ⁻⁶ ±2,72x10 ⁻⁸	84,0	
	6,00x10 ⁻⁶	5,00x10 ⁻⁶ ±2,68x10 ⁻⁹	83,3	
	1,00x10 ⁻⁵	7,77x10 ⁻⁶ ±5,72 x10 ⁻⁷	77,7	

média ± desvio padrão; n=3; t tabelado= 3,18 (95%)

Os valores de recuperação de cetoconazol para as amostras farmacêuticas variaram de 75,2 a 98,5%, enquanto que para as amostras de água de rio ficaram na faixa de 75,6 a 108%. Nos dois casos, a maioria das adições ficaram dentro do estabelecido, recuperações variando entre 80 a 110%.

Podemos verificar que a influência da matriz da amostra verificada (75,2 a 78,6%) na determinação de CTZ em todas as formulações farmacêuticas com a adição da concentração mais elevada ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Enquanto que nas amostras de água apenas a primeira adição de padrão do ponto D demonstrou a influência da matriz da amostra, com recuperação de 75,6%, abaixo da faixa estabelecida de 80 a 120% [83, 84, 85].

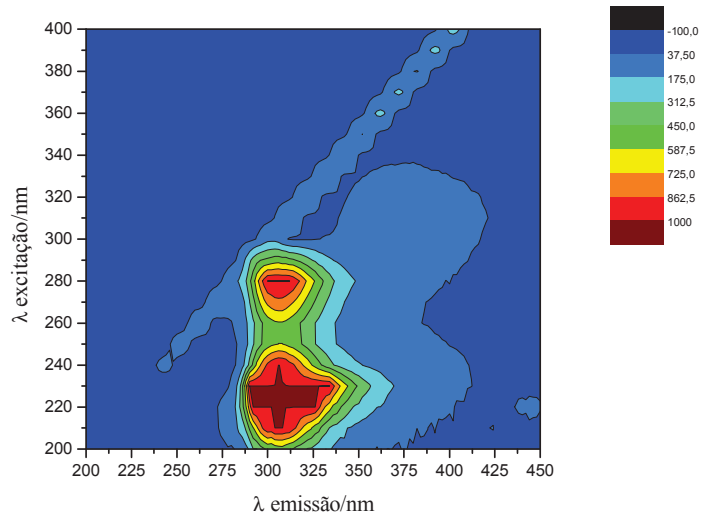
Exceto as amostras farmacêuticas com adição de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CTZ que demonstraram influência da matriz da amostra, o ensaio de recuperação das amostras farmacêuticas e de água indicam uma boa exatidão do método proposto. Com isso, usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do procedimento. Neste caso considerou-se a recuperação média (Rec), sendo estabelecida como hipótese nula (H_0): $\text{Rec} = 100\%$ e como hipótese alternativa (H_1): $\text{Rec} \neq 100\%$ (teste bilateral). O teste t aplicado, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentaram valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado.

4.3 Espectrofluorimetria para determinação de Bisfenol A em água de rio

4.3.1 Espectros de excitação e emissão

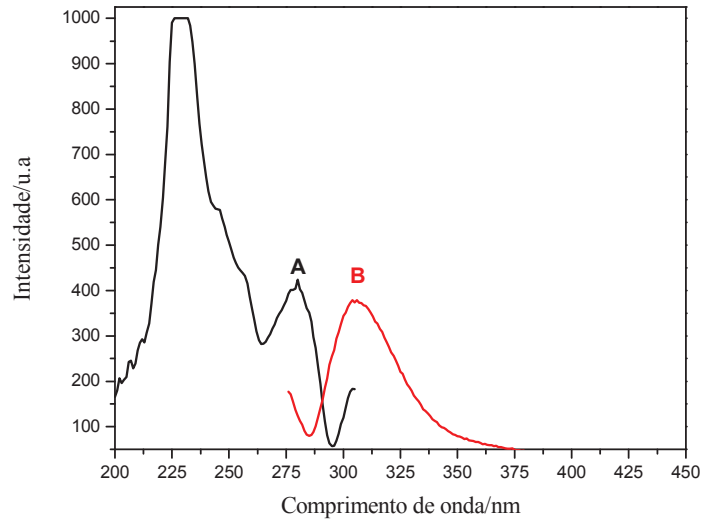
Para a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão foi obtido um espectro de fluorescência 3D de uma solução padrão de BFA na concentração de $3,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol. Os espectros de fluorescência tridimensional da Figura 32 mostram dois comprimentos de onda máximos de excitação em $\lambda_{\text{ex}} = 227$ e 276 nm , e um comprimento de onda de máximo de emissão a $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$. Todas as leituras para a determinação de BFA foram realizadas no módulo alto, pois obteve-se maior e melhor linearidade da curva analítica, além de resultados de recuperação mais promissores.

Figura 31- Matriz de excitação e emissão de Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em etanol.



A intensidade de emissão com $\lambda_{\text{ex}}=227$ nm foi cerca de 3 vezes mais elevada quando comparada com a emissão em $\lambda_{\text{ex}}=276$ nm. Este fato, dificultaria as análises sendo necessário realizar diluições, desta maneira, o λ_{ex} de 276 nm foi o escolhido para os trabalhos (Figura 33).

Figura 32- Espectro de (A) excitação e (B) emissão do Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm).

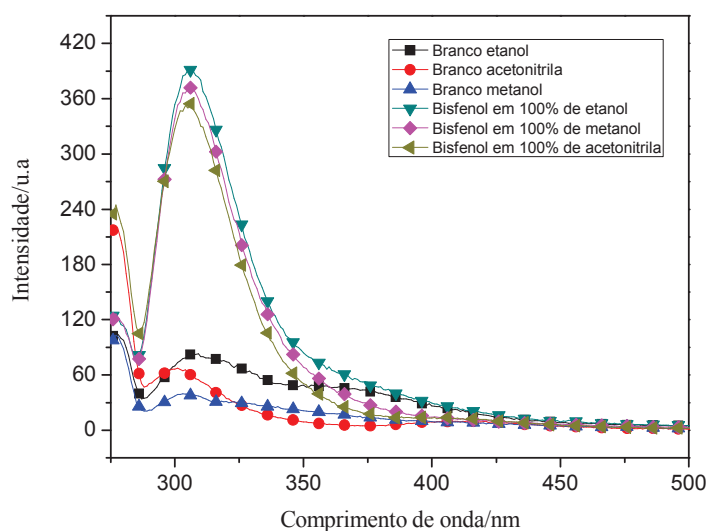


4.3.2 Efeito do solvente sobre a intensidade fluorescência do Bisfenol A

Buscando escolher o solvente mais adequado para determinação de BFA utilizando o método proposto, avaliou-se sua intensidade de fluorescência em uma concentração fixa de $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em três solventes etanol, metanol (próticos) e acetonitrila (aprótico).

O BFA mostra fluorescência nativa com excitação e emissão em 276 e 306 nm, respectivamente, esses λ não foram influenciados pela polaridade do solvente, e não houve mudança do máximo λ de emissão do analito (Figura 34).

Figura 33- Espectro de emissão do Bifenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em diferentes solventes.



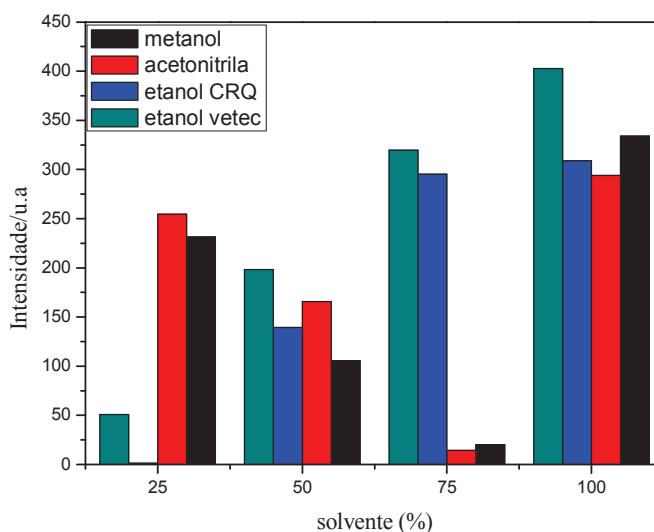
Quando dissolvido nos solventes puros observa-se que BFA apresenta maior intensidade de fluorescência em etanol (390 nm), seguido pelo metanol 370 nm e acetonitrila com a menor intensidade (350 nm).

Os solventes avaliados isoladamente sem a presença do analito (branco) mostram intensidade de fluorescência intrínseca de 79 nm para o etanol, 67 nm para acetonitrila e 38 nm para o metanol em seus λ de máxima emissão.

Segundo[74] o sinal de fluorescência máxima é obtido em solventes orgânicos polares, tais como metanol ou etanol, mas em água o sinal diminui acentuadamente. Dessa forma, a intensidade de fluorescência do BFA é muito mais elevada em meios orgânicos e assim, a sensibilidade é dependente da composição do solvente. Por isso, buscou-se investigar diferentes proporções de solvente e água, afim de chegar na melhor composição do solvente para a determinação do analito.

Os solventes avaliados foram duas marcas de etanol (etanol A e etanol B), metanol e acetonitrila. Observa-se na Figura 34, as duas marcas de etanol tiveram comportamento muito semelhante com uma pequena diferença na intensidade do sinal analítico, fato que já era esperado devido as diferenças entre fabricantes. A intensidade aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de etanol.

Figura 34- Bifenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em metanol, acetonitrila, etanol A (Vetec) e etanol B (CRQ).



O comportamento de acetonitrila e metanol sobre a intensidade da fluorescência do BFA foram semelhantes entre si, porém opostos ao etanol até 75% de solvente (75:25 solvente:água), em que a intensidade de fluorescência diminuiu com o aumento da concentração dos solventes. Entretanto quando a detecção de BFA é realizada em solvente puro, 100% (100:0 acetonitrila ou metanol:água) o sinal analítico aumentou significativamente.

Na comparação entre os três solventes, comportamento semelhante é observado nas proporções referentes a 50 e 100% de solvente.

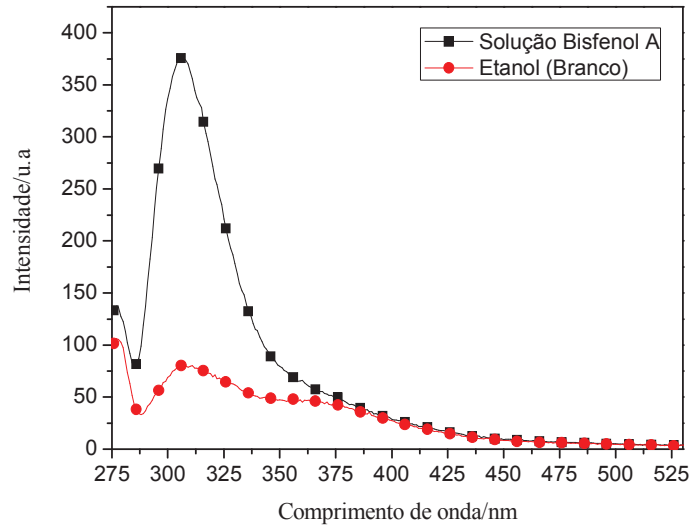
Etanol, metanol e acetonitrila tiveram o máximo de intensidade do sinal analítico em 100% de solvente. Fato que demonstra que independentemente do solvente escolhido, para uma maior sensibilidade utilizando a espectrofluorimetria, o BFA deve ser solubilizado em solvente puro, sem a adição de água, já que esta é responsável pela supressão do sinal.

Os três solventes podem ser utilizados para determinação de BFA por fluorimetria, mas optou-se pela escolha do etanol por ser um solvente menos tóxico e mais barato que os outros dois solventes estudados.

A Figura 35 mostra o espectro de emissão de BFA $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e do etanol (branco). Observa-se que o branco tem uma intensidade de fluorescência relativamente

elevada (79 nm), por isso, todas as medidas realizadas tiveram seus valores do branco devidamente subtraído.

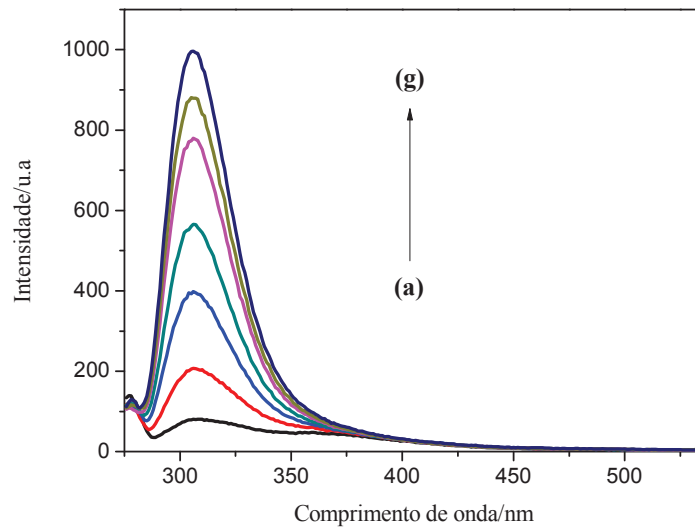
Figura 35- Espectro de emissão do Bisfenol A $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em etanol e do branco (etanol). ($\lambda_{\text{ex}} = 276$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 306$ nm).



4.3.3 Parâmetros analíticos de espectrofluorimetria para a determinação de Bisfenol A

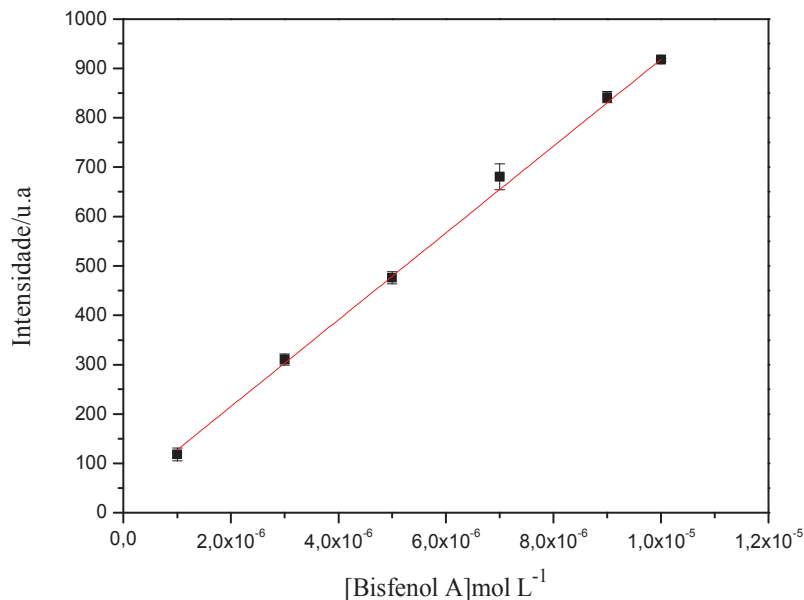
A curva analítica foi obtida a partir leituras em duplicata de soluções de referência de BFA, preparadas diariamente em etanol. Sob as condições otimizadas, verificou-se uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de BFA no intervalo de $7,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($159,8$ a $2282,9$ $\mu\text{g L}^{-1}$). A equação que descreve a curva de calibração é $I = 8,79 \times 10^7 C_{\text{BFA}} + 39,45$; $r = 0,9998$, onde I é a intensidade de emissão (u.a) e C_{BFA} a concentração de Bisfenol A em mol L⁻¹. Os espectros de emissão das soluções padrão em seis concentrações diferentes de BFA são apresentados na Figura 36.

Figura 36- Espectro de emissão da curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$). (a) branco; (b) $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $3,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $7,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $9,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (g) $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



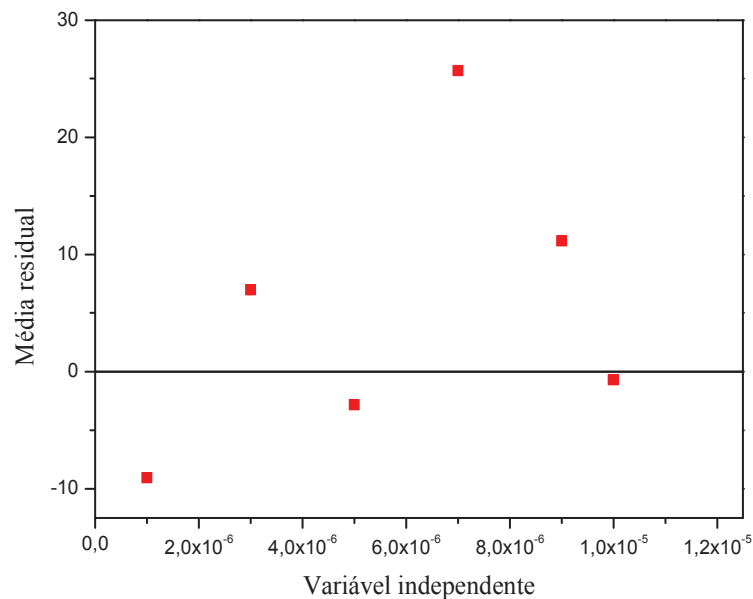
A Figura 37 mostra a curva analítica para a determinação de BFA. A intensidade de fluorescência é proporcional a concentração.

Figura 37- Curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$).



Em seguida, avaliou-se o gráfico dos resíduos da curva analítica. Podemos observar na Figura 38 que o gráfico de resíduos mostra uma distribuição aleatória dos pontos ao redor da reta de regressão descrita pela equação da curva analítica, o que é desejado para uma curva de calibração com boa linearidade.

Figura 38- Gráfico de resíduo dos dados empregados na construção da curva analítica para a determinação de Bisfenol A em etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$).



Uma análise de variância também foi realizada com os dados da curva analítica do BFA ao utilizar o método de espectrofluorimetria. A variância permite avaliar a significância da regressão. Como mostrado na Tabela 19, o elevado valor de F (9622,29) indica a existência de uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o recomendado (2,77).

Tabela 19- Análise de variância da curva analítica para determinação de Bisfenol A.

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	7212,85	7212,85	9622,29	$6,47 \times 10^{-8}$
Resíduo	4	2,99	0,75		
Total	5	7215,85			

Os limites de detecção e de quantificação obtidos nas condições otimizadas foram de $7,37 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($168,2 \mu\text{g L}^{-1}$) e $1,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($321,8 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

O limite de detecção foi determinado a partir de 10 medidas do branco do procedimento, obtendo-se a média e o desvio padrão desse conjunto de medidas. O limite de detecção foi calculado ($3 \times \text{desvio padrão do erro do intercepto} + \text{intercepto} / \text{inclinação da curva analítica}$), e de modo semelhante, estimou-se o limite de quantificação ($10 \times \text{desvio padrão do erro do intercepto} + \text{intercepto} / \text{inclinação da curva analítica}$).

A Tabela 20 apresenta as equações das curvas de calibração do BFA e seus respectivos coeficientes de regressão. As inclinações das curvas analíticas avaliadas indicam uma boa sensibilidade do método espectrofluorimétrico. Além de boa linearidade dentro da faixa de concentração estudada com coeficientes de regressão maiores que 0,99 nm[83, 84].

Avaliou-se o efeito da marca do solvente sobre as equações que descrevem as curvas analíticas. Estas foram obtidas empregando 2 marcas diferentes (etanol A e etanol B). Utilizou-se ainda soluções estoques feitas em diferentes dias para a construção de cada curva presente na Tabela 20, com o objetivo de avaliar as sensibilidade das curvas analíticas obtidas para a determinação de bisfenol-A.

Tabela 20- Equações das curvas analíticas para determinação de Bisfenol A em duas marcas diferentes de etanol.

Solvente	Equação da curva analítica	r
Etanol A*	$I = 1,08 \times 10^8 (\pm 1,93 \times 10^6) \times C_{\text{BFA}} + 21,8 (\pm 1,86)$	0,999
Etanol A*	$I = 1,06 \times 10^8 (\pm 1,87 \times 10^6) \times C_{\text{BFA}} + 36,4 (\pm 6,95)$	0,999
Etanol B**	$I = 8,79 \times 10^7 (\pm 8,96 \times 10^5) \times C_{\text{BFA}} + 39,4 (\pm 8,46)$	0,999

*Etanol A refere-se à marca Vetec e **Etanol B refere-se à marca CRQ.

C_{BFA} = Concentração de Bisfenol A

Podemos observar com os dados da Tabela 20 que o DPR dos coeficientes angulares é de 11,00% e que marca do solvente influencia na sensibilidade do procedimento espectrofluorimétrico proposto, pois as inclinações das curvas analíticas obtidas com diferentes solventes são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.3.4 Avaliação da recuperação do Bisfenol A em água de rio

No teste de recuperação do analito, quatro concentrações diferentes de solução de referência de BFA ($1,00 \times 10^{-6}$, $3,00 \times 10^{-6}$, $5,00 \times 10^{-6}$ e $7,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) são adicionadas a soluções de amostras de água de rio e os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados.

Foram avaliadas quatro amostras de água de rio (pontos A, B, C e D), os resultados estão apresentados na Tabela 21. Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, sendo estabelecida como hipótese nula (H_0): Rec = 100% e como hipótese alternativa (H_1): Rec. \neq 100% (teste bilateral). O teste t aplicado, com 95% de confiança e n-

1 grau de liberdade, apresentaram valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado.

Os valores de recuperação de BFA para as quatro amostras de água de rio variaram entre 70,5 a 106%.

Podemos verificar a influência da matriz da amostra para a menor concentração de fortificação (70,5; 70,8 e 70,7%) abaixo da faixa estabelecida de 80 a 120% [83, 84, 85]. A recuperação média foi adequada para todas as amostras, mostrando a exatidão do procedimento desenvolvido para a quantificação de BFA nas amostras analisadas. Os CVs das recuperações variaram de 0,25 a 9,15%, indicando a reprodutibilidade adequada do procedimento para a determinação nestes níveis de concentração.

Tabela 21- Ensaio de recuperação para a determinação de Bisfenol A em amostras de água de rio em etanol B (CRQ).

Amostra	Bisfenol A / mol L ⁻¹		Recuperação (%)	t _{calculado}
	Adicionado	Encontrado		
Ponto A	1,00x10 ⁻⁶	7,05x10 ⁻⁷ ± 1,21x10 ⁻⁸	70,5	-0,67
	3,00x10 ⁻⁶	2,94x10 ⁻⁶ ± 2,59x10 ⁻⁸	98,0	
	5,00x10 ⁻⁶	5,03x10 ⁻⁶ ± 1,43x10 ⁻⁷	101	
	7,00x10 ⁻⁶	7,44x10 ⁻⁶ ± 6,44x10 ⁻⁸	106	
Ponto B	1,00x10 ⁻⁶	7,08x10 ⁻⁷ ± 1,80x10 ⁻⁹	70,8	-0,86
	3,00x10 ⁻⁶	2,76x10 ⁻⁶ ± 1,75x10 ⁻⁸	91,9	
	5,00x10 ⁻⁶	5,17x10 ⁻⁶ ± 1,79x10 ⁻⁷	103	
	7,00x10 ⁻⁶	7,24x10 ⁻⁶ ± 1,14x10 ⁻⁷	103	
Ponto C	1,00x10 ⁻⁶	8,00x10 ⁻⁷ ± 3,99x10 ⁻⁸	80,0	-0,99
	3,00x10 ⁻⁶	2,88x10 ⁻⁶ ± 7,00x10 ⁻⁸	96,1	
	5,00x10 ⁻⁶	4,96x10 ⁻⁶ ± 2,18x10 ⁻⁷	99,3	
	7,00x10 ⁻⁶	7,13x10 ⁻⁶ ± 2,7x10 ⁻⁸	102	
Ponto D	1,00x10 ⁻⁶	7,07x10 ⁻⁷ ± 3,21x10 ⁻⁸	70,7	-1,17
	3,00x10 ⁻⁶	2,73x10 ⁻⁶ ± 2,17x10 ⁻⁷	91,0	
	5,00x10 ⁻⁶	5,07x10 ⁻⁶ ± 4,64x10 ⁻⁷	101	
	7,00x10 ⁻⁶	6,94x10 ⁻⁶ ± 1,76x10 ⁻⁷	99,2	
média ± desvio padrão; n=3; t tabelado= 3,18 (95%)				

5 CONCLUSÕES

A metodologia proposta envolvendo espectrofotometria derivada para a determinação dos antioxidantes BHA e BHT demonstrou ser uma alternativa vantajosa e viável para a solução de problemas de sobreposição espectral. Assim, foi possível diminuir problemas de interferência entre os antioxidantes sem complicados procedimentos de preparo de amostra e extração para separação prévia dos analitos.

Considerando que resíduos farmacêuticos contendo CTZ e resíduos de forma geral contendo BFA podem ser frequentemente encontrados em águas superficiais, a técnica de espectrofluorimetria pode ser uma aliada no controle destes analitos em ambientes aquáticos, podendo contribuir para a fiscalização de descartes de resíduos irregulares em concentrações acima do limite permitido em recursos hídricos.

A preocupação com preservação dos ecossistemas aquáticos e com o risco eminente da contaminação da água de abastecimento público da cidade de Dourados/MS, este trabalho objetivou, identificar resíduos de fármacos e desreguladores endócrinos em especial o Cetoconazol e Bisfenol A, para que após a disponibilização dos resultados à sociedade, seja possível minimizar o descarte de resíduos contendo estes e outros contaminantes de forma inadequada e que processos eficientes para removê-los dos recursos hídricos sejam desenvolvidos.

Os três procedimentos espectrofotométricos desenvolvidos demonstraram ser boas opções de procedimentos alternativos aos métodos cromatográficos. Os resultados comprovaram a seletividade, sensibilidade e exatidão dos métodos para determinação de BHA, BHT, Cetoconazol e Bisfenol A nas amostras avaliadas. Não houve necessidade de complicados tratamentos de amostra, o que proporciona maior rapidez e facilidade aos métodos, e ao evitar um elevado consumo de solventes orgânicos diminui-se drasticamente a geração de resíduos e custos com reagentes, quando comparado com métodos cromatográficos.

6 REFERÊNCIAS

- [1] SKOOG, D. A. W., D.M; HOLLER, F.J. CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química analítica**. 2008.
- [2] CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**. Curitiba, Departamento de Química - Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação de Mestrado. 97 p.
- [3] PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 105-113, 2003.
- [4] VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 230-233, 2006.
- [5] DONATO, E. M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-130, 2010.
- [6] ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.
- [7] HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: 2008.
- [8] SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.
- [9] TREVISAN, M. G. **Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas**. Campinas, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, 2003. Mestrado. 86 p.
- [10] MEIRA, M.; QUINTELLA, C. M.; FERRER, T. M.; SILVA, H. R. G. D.; GUIMARÃES, A. K.; SANTOS, M. A.; NETO, P. R. D. C.; PEPE, I. M. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3d e análise das componentes principais. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 621-624, 2011.
- [11] ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 4. Viçosa: 2008. 596.
- [12] OLIVEIRA, L. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.
- [13] DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

- [14] RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.
- [15] MASUCHI, M. H.; CELEGHINI, R. M. D. S.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. **Química Nova**, v. 31, p. 1053-1057, 2008.
- [16] TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, p. 1189-1194, 2009.
- [17] PEREIRA, M. O. D. S. **Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos**. Lisboa, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, 2010. Dissertação de Mestrado. 40 p.
- [18] CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; VALENCIA, M. C.; NICOLÁS, E. A. Solid-phase ultraviolet absorbance spectrophotometric multisensor for the simultaneous determination of butylated hydroxytoluene and co-existing antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 179-186, 2004.
- [19] MEDEIROS, R. A. **Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de antioxidantes e corantes em produtos alimentícios empregando um eletrodo de diamante dopado com boro**. São Carlos, Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, 2011. Tese de Doutorado. 155 p.
- [20] CAMPOS, G. C. M. D.; TOLEDO, M. C. D. F. Determinação de BHA, BHT e TBHQ em óleos e gorduras por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of food technology**, v. 3, p. 65-71, 2000.
- [21] MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry** v. 123, p. 886-891, 2010.
- [22] LIN, X.; NI, Y.; KOKOTC, S. Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 54-62, 2013.
- [23] FREITAS, K. H. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ immobilized in polyester resin. **Talanta** v. 81, p. 1102-1108, 2010.
- [24] DING, M.; ZOU, J. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. **Food Chemistry** v. 131, p. 1051-1055, 2012.
- [25] YANG, M.-H.; LIN, H.-J.; CHOONG, Y.-M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. **Food Research International** v. 35, p. 627-633, 2002.
- [26] TOMÁŠKOVÁ, M.; LKOVÁ, J. C.; JEHLICĀKA, V.; NAVRÁTIL, T.; ŠVANCARA, I.; ŠELEŠOVSKÁ, R. Simultaneous determination of BHT and BHA in mineral and

- synthetic oils using linear scan voltammetry with a gold disc electrode. **Fuel**, v. 123, p. 107–112, 2014.
- [27] ROBLEDO, S. N.; ZÓN, M. A.; CEBALLOS, C. D.; FERNÁNDEZ, H. Qualitative and quantitative electroanalysis of synthetic phenolic antioxidant mixtures in edible oils based on their acid–base properties. **Food Chemistry** v. 127, p. 1361–1369, 2011.
- [28] CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A. S.; BOYLE, E. M.; GUTIÉRREZ, A. F. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. **Talanta** v. 50 p. 1099–1108, 1999.
- [29] WANG, J.-Y.; WU, H.-L.; CHEN, Y.; ZHAI, M.; QING, X.-D.; YU, R.-Q. Quantitative determination of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in cosmetics using three-dimensional fluorescence coupled with second-order calibration **Talanta**, v. 116, p. 347–353, 2013.
- [30] NI, Y.; LIU, C. Artificial neural networks and multivariate calibration for spectrophotometric differential kinetic determinations of food. **Analytica Chimica Acta** v. 396, p. 221–230, 1999.
- [31] PRASAD, U. V.; DIOAKAR, T. E.; HARIPRASAD, K.; SASTRY, C. S. P. Spectrophotometric Determination of Some Antioxidants in Oils and Fats. **Food Chemistry** v. 25, p. 159-164, 1987.
- [32] PRASAD, U. V.; RAO, K. E.; SASTRY, C. S. P. Spectrophotometric Determination of Some Antioxidants with Potassium Permanganate and Metol. **Food Chemistry** v. 17, p. 209-213, 1985.
- [33] BOYCE, M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 369–375, 1999.
- [34] YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M.; DÍEZ, L. M. P. Determination of tert-butylhydroxyanisole and tert-butylhydroxytoluene by flow injection with amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 252, p. 153-159, 1991
- [35] KULYS, J.; BRATKOVSKAJA, I. Antioxidants determination with laccase. **Talanta** v. 72, p. 526–531, 2007.
- [36] 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, n. No. 1, p. 188-197, 2009.
- [37] SILVA, C. G. A. D.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- [38] LIMA, B. D. **Otimização e validação de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto e análise por CG-EM**. Ouro Preto, MG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Ouro Preto, 2013. 104 p.
- [39] VERGEYNST, L.; HAECK, A.; DE WISPELAERE, P.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid

- chromatography-magnetic sector mass spectrometry: Method quality assessment and application in a Belgian case study. **Chemosphere**, v. 119, Supplement, n. 0, p. S2-S8, 2015.
- [40] ZHOU, Q.; GAO, Y.; XIE, G. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. **Talanta**, v. 85, p. 1598, 2011.
- [41] CRUZ-MORATÓ, C.; LUCAS, D.; LLORCA, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; VICENT, T.; SARRÀ, M.; MARCO-URREA, E. Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. **Science of The Total Environment**, v. 493, n. 0, p. 365-376, 2014.
- [42] BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. No. 4, p. 523-530, 2003.
- [43] QUEIROZ, F. B. D. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em mostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de Massas**. Ouro Preto, MG, Universidade Federal de Ouro Preto, 2011. Dissertação de Mestrado. 114 p.
- [44] SANTOS, J. L.; RIBEIRO, Y. A.; SALGADO, H. R. N.; CHUNG, M. C. Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 161-165, 2009.
- [45] RUBIM, A. M.; SANTOS, M. R. D.; LAPORTA, L. V.; RUBENICK, J. B.; SANTOS, T. S. D. Validação de metodologia por UV/VIS para quantificação de cetoconazol em comprimidos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 510-514, 2012.
- [46] GINDRI, A. L.; GINDRI, L. L.; SOUZA, L. B. D.; SANTOS, M. R. D.; LAPORTA, L. V. Estudo da estabilidade acelerada de formulações contendo cetoconazol xampu a 2%. **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 1, p. 139-149, 2012.
- [47] JÚNIOR, F. D. R. P. **Suspensões e formulações tópicas contendo nanocápsulas e micropartículas de cetoconazol: avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana**. Santa Maria, RS, Centro Universitário Franciscano, 2011. Dissertação de Mestrado. 99 p.
- [48] PROENÇA, K. D. S.; OLIVEIRA, R. V. M. D.; GONÇALVES, M. M.; VILA, M. M. D. C. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise quantitativa de cetoconazol em xampus. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 187-190, 2007.
- [49] VOJIC, M. P.; POPOVIC, G. V.; SLADIC, D. M.; PFENDT, L. B. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 70, n. 1, p. 67-78, 2005.

- [50] SKIBA, M.; SKIBA-LAHIANI, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, p. 1-6, 2000.
- [51] ABDEL-MOETY, E. M.; KHATTAB, F. I.; KELANI, K. M.; ABOUAL-ALAMEIN, A. M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. **II Farmaco**, v. 57, p. 931-938, 2002.
- [52] VELIKINAC, I.; CUDINA, O.; JANKOVIC', I.; AGBABA, D.; VLADIMIROV, S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. **II Farmaco**, v. 59, p. 419-424, 2004.
- [53] DANTAS, A. N. D. S.; SOUZA, D. D.; LIMA, J. E. S. D.; LIMA-NETO, P. D.; CORREIA, A. N. Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 9083-9089, 2010.
- [54] ARRANZ, A.; ECHEVARRÍA, C.; MOREDA, J. M.; CID, A.; ARRANZ, J. F. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p. 339-402, 2000.
- [55] FARHADI, K.; MALEKI, R. Triiodide ion and alizarin red S as two new reagents for the determination of clotrimazole and ketoconazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1023-1033, 2002.
- [56] S.RANE, S.; P.PADMAJA. Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions **Journal of Pharmaceutical Analysis**, n. 1, p. 43-47, 2012.
- [57] KHASHABA, P. Y.; EL-SHABOURI, S. R.; EMARA, K. M.; MOHAMED, A. M. Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 363-376, 2000.
- [58] STEENE, J. C. V. D.; LAMBERT, W. E. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p. 153-160, 2008.
- [59] BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- [60] RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Campinas, Departamento de Química Analítica - Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação de Mestrado. 108 p.
- [61] LOPES, L. G.; MARY R. R. MARCHI, J. B. G. S. E. J. A. M.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboaticabal - São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.
- [62] BESERRA, M. R.; SCHIAVINI, J. D. A.; RODRIGUES, W. C.; PEREIRA, C. D. S. S. O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. **Revista Eletrônica TECEN**, v. 5, n. 1, p. 37-46, 2012.

- [63] MONTAGNER, É. **Determinação de Bisfenol A em água: uma investigação na cidade de Campo Grande – MS**. Araraquara, Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, 2010. Tese de Doutorado. 146 p.
- [64] JÚNIOR, G. F. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para determinação de Bisfenol A em simulantes de alimentos de ensaios de migração**. Fortaleza, Departamento de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará, 2012. Dissertação de Mestrado. 101 p.
- [65] MATTA, M. H. D. R. D.; PEREIRA, A. L.; MONTAGNER, É.; FORTUNATO, G. V. Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 624-629, 2012.
- [66] GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o Exemplo do Bisfenol-A. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 44, n. 4, p. 323-330, 2000.
- [67] BERALDO, D. A. D. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP**. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2012. Dissertação de Mestrado. 79 p.
- [68] XAVIER, T. M. R. **Mineralização de timol e bisfenol A via ozônio, radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio**. Piracicaba-SP, Centro de energia nuclear na agricultura - Universidade de São Paulo, 2011. Mestrado. 105 p.
- [69] COSTA, L. A. **Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de Bisfenol A em amostras de águas naturais por CG-EM**. Campo Grande, MS, Departamento de Hidráulica e Transportes - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008. Dissertação de Mestrado. 65 p.
- [70] SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. **Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais**. Campinas, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, 2007. 27 p.
- [71] REZAEI, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR, M. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1511-1514, 2009.
- [72] SELVARAJ, K. K.; SHANMUGAM, G.; SAMPATH, S.; LARSSON, D. G. J.; RAMASWAMY, B. R. GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 99, p. 13-20, 2014.
- [73] WANG, X.; ZENG, H.; WEI, Y.; LIN, J.-M. Reversible fluorescence sensor based on insoluble B-cyclodextrin polymer for direct determination of bisphenol A (BPA). **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 565-572, 2006.
- [74] OLMO, M. D.; ZAFRA, A.; JURADO, A. B.; VILCHEZ, J. L. Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). **Talanta**, v. 50, p. 1141-1148, 2000.

- [75] YU, X.; CHEN, Y.; CHANG, L.; ZHOU, L.; TANG, F.; WU, X. B-cyclodextrin non-covalently modified ionic liquid-based carbon paste electrode as a novel voltammetric sensor for specific detection of bisphenol A. **Sensors and actuators B**, v. 186, p. 648-656, 2013.
- [76] BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUIZ, F.-J.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 51-59, 2007.
- [77] RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L. D.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 85-92, 2004.
- [78] WANG, X.; ZENG, H.; ZHAO, L.; LIN, J.-M. Selective determination of bisphenol A (BPA) in water by a reversible fluorescence sensor using pyrene/dimethyl α -cyclodextrin complex. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 313-318, 2006.
- [79] LEE, C.-C.; JIANG, L.-Y.; KUO, Y.-L.; HSIEH, C.-Y.; CHEN, C. S.; TIEN, C.-J. The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. **Chemosphere**, n. 91, p. 904-911, 2013.
- [80] FAN, J.; GUOA, H.; LIU, G.; PENG, P. Simple and sensitive fluorimetric method for determination of environmental hormone bisphenol A based on its inhibitory effect on the redox reaction between peroxy radical and rhodamine 6G. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 134-138, 2007.
- [81] YIN, H.; ZHOU, Y.; AI, S.; CHEN, Q.; ZHU, X.; LIU, X.; ZHUB, L. Sensitivity and selectivity determination of BPA in real water samples using PAMAM dendrimer and CoTe quantum dots modified glassy carbon electrode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 236-243, 2010.
- [82] ZHANG, J.; ZHAO, S.-Q.; ZHANG, K.; ZHOU, J.-Q. Cd-doped ZnO quantum dots-based immunoassay for the quantitative determination of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 95, p. 105-110, 2014.
- [83] (ANVISA), A. N. D. V. S. Resolução RE nº 899. v. publicada em 2/6/2003, 29/05/2003.
- [84] Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products. Disponível em: <http://apvma.gov.au/node/1048>. Acesso em: 30/08/2014
- [85] GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1998.