

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

HERBERT LEE BAROBOSA VERÍSSIMO DE BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE DICLOFENACO E
SULFAMETOXAZOL EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DOURADOS/MS

FEVEREIRO/2014

HERBERT LEE BAROBOSA VERÍSSIMO DE BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
DICLOFENACO E SULFAMETOXAZOL EM AMOSTRAS DE
ÁGUAS**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção de título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração: CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

DOURADOS-MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

B277d Barros, Herbert Lee Barbosa Veríssimo.
Desenvolvimento de procedimentos
espectrofluorimétricos para a determinação de
diclofenaco e sulfametoxazol em amostras de águas /
Herbert Lee Barbosa Veríssimo de Barros – Dourados,
MS : UFGD, 2014.
66 f.

Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia
Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Fármacos em água. 2. Diclofenaco. 3.
Sulfametoxazol. I. Vieira, Heberth Juliano. II. Título.

CDD: 615

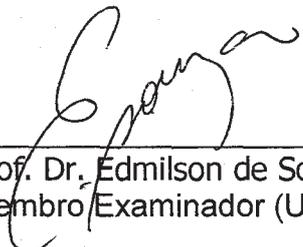


Termo de Aprovação

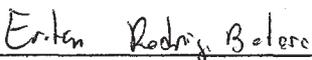
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para determinação de diclofenaco e sulfametoxazol em amostras de águas”, de autoria de **Herbert Lee Barbosa Veríssimo de Barros**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



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



Prof. Dr. Edmilson de Souza
Membro Examinador (UEMS)



Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Membro Examinador (UFGD)

RESUMO

As atividades antropogênicas tem despejado grande variedade e quantidade de poluentes nas águas de rios, causando poluição que leva a necessidade de tratamento de água adequado. O controle dessas substâncias na água é imprescindível para verificar a eficiência do tratamento. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de diclofenaco e sulfametoxazol em águas de águas de superfície. O procedimento para a determinação de diclofenaco é baseado na emissão de radiação intrínseca do diclofenaco em 370 nm, quando excitado em 245 nm. A relação entre a intensidade de emissão das soluções contendo diclofenaco e sua concentração pode ser descrita com uma equação polinomial. O uso de solução de Rodamina-B como padrão interno transformou em uma relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração de diclofenaco. Após a otimização do procedimento, uma curva analítica com faixa de concentração variando entre $5,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi obtida empregando a Rodamina-B como padrão interno. Um limite de detecção de $2,74 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e recuperações entre 71,2 a 95 % nas amostras de águas de superfícies avaliadas foram obtidos. Outro procedimento foi proposto para a determinação de sulfametoxazol em amostras de águas foi descrito empregando rodamina-B como padrão interno e detecção espectrofluorimétrica. O procedimento é baseado na emissão de radiação do sulfametoxazol em 350 nm quando excitada em 260 nm. A adição da rodamina-B como padrão interno permitiu a obtenção de uma curva analítica linear. Depois de otimizado, o procedimento apresentou uma curva analítica com faixa de variação de concentração de sulfametoxazol entre $2,34 \times 10^{-7}$ a

$4,09 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O limite de detecção e quantificação de $3,53 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,18 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foram obtidos. As recuperações do sulfametoxazol nas amostras de águas de superfície avaliadas apresentaram valores variando entre 71,6 a 127 %. Ambos os procedimentos desenvolvidos permitem a determinação dos princípios ativos em águas de superfície de maneira rápida e sem a necessidade de tratamento de amostra.

Palavras-chaves: fármacos; espectrofluorimetria; Rodamina-B; águas de superfície; padrão interno.

Abstract

A large variety and quantity of pollutants have been dumped into rivers by anthropogenic activities, caused by pollution that leads to the need for an appropriate water treatment. The control of these substances into the water is essential to verify the efficiency of the treatment. This work aims for the development of a spectrofluorimetric procedure for the determination of diclofenac and sulfamethoxazole in surface water. The procedure is based on the intrinsic radiation emission of diclofenac at 370 nm when excited at 245 nm. The emission intensity of solutions containing diclofenac and its concentration can be described by a polynomial equation. Using a solution of Rhodamine-B as an internal standard turned into a linear relation between emission intensity and the concentration of diclofenac. After the optimization procedure, a calibration curve with a concentration range varying between 5.00×10^{-6} to 1.00×10^{-4} mol L⁻¹ was obtained using Rhodamine-B as an internal standard. A detection limit of 2.74×10^{-6} mol L⁻¹ was obtained. The recoveries ranged from 71.2 to 95.0 % in surface water samples analyzed. Another procedure with spectrofluorimetric detection has been proposed for the determination of sulfamethoxazole in water samples, described using Rhodamine-B as an internal standard. The procedure is based on the radiation emission of sulfamethoxazole at 350 nm when excited at 260 nm. The addition of Rhodamine-B as an internal standard has obtained a linear calibration curve. Once optimized, the procedure has presented an analytical curve range for sulfamethoxazole concentration between 2.34×10^{-7} to 4.09×10^{-5} mol L⁻¹. The limit of detection and quantification of 3.53×10^{-8} mol L⁻¹ and 1.18×10^{-7} mol L⁻¹ were obtained. The recovery of sulfamethoxazole in surface water samples analyzed, it has showed values ranging from 71.6 to

127 % Both developed procedures allowed to find active principles on surface water quickly and without the need for a sample treatment.

Keywords : drugs ; spectrofluorimetry ; rhodamine B; water ; internal standard.

.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular DCF.....	3
Figura 2. Estrutura do SMZ.....	5
Figura 3. Estrutura molecular da Rodamina-B.	8
Figura 4. Faixa de comprimentos de ondas do espectro eletromagnético.	17
Figura 5. Diagrama de Jablonski.	19
Figura 6. Matriz emissão e excitação das amostras avaliadas de águas dos córregos.	34
Figura 7. Matriz excitação e emissão de uma solução padrão de DCF 1×10^{-4} mol/L em solução tampão fosfato de potássio 0,10 mol/L (pH 6,0).....	35
Figura 8. Matriz de excitação e emissão de uma solução padrão de Rodamina-B em meio aquoso.....	36
Figura 9. Influência do pH do meio nos espectros de emissão de solução padrão de DCF 1×10^{-4} mol/L. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm.	37
Figura 10. Influência do pH sobre a intensidade de emissão de uma solução padrão de DCF em diferentes soluções tampão, com força iônica controlada. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm (n=2).....	37
Figura 11. Curva analítica para a determinação de DCF. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm (n=2).....	38
Figura 12. Curva analítica para a determinação de DCF em amostras de águas. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm (n=2).....	39
Figura 13. Gráficos de resíduos em função da concentração.	40
Figura 14. Espectros de emissão de soluções padrão de diclofenaco obtidos em meio contendo Rodamina-B 1×10^{-7} mol/L como fluoróforo e pH=6,0. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm.....	42
Figura 15. Curva analítica para a determinação de DCF, obtida o uso do padrão interno Rodamina-B. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm (n=2).....	43
Figura 16. Gráfico de resíduos dos dados empregados na construção da curva analítica utilizando-se Rodamina-B.....	44
Figura 17. Matriz de excitação-emissão do sulfametoxazol.....	50
Figura 18. Influência do pH do meio nos espectros de emissão de solução padrão de SMZ $2,37 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm (n=2).....	51
Figura 19. Influência do pH sobre a intensidade de emissão de uma solução padrão de SMZ $2,37 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm (n=2).....	52
Figura 20. Espectros de emissão de soluções padrão de SMZ utilizados para a obtenção da curva analítica. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm.	53
Figura 21. Curva analítica para a determinação espectrofluorimétrica de SMZ. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm (n=2).....	54
Figura 22. Curva analítica para a determinação de SMZ em amostras de águas. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm e pH 6,0 (n=2).....	55
Figura 23. Gráfico de resíduos da curva analítica para a determinação de SMZ em amostras de águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto.	55
Figura 24. Espectro de emissão da curva analítica SMZ empregando solução de Rodamina-B 2×10^{-7} mol L ⁻¹ como padrão interno. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm (n=2).....	59
Figura 25. Curva analítica para a determinação de SMZ utilizando solução de Rodamina-B 2×10^{-7} mol L ⁻¹ como padrão interno. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm (n=3).....	60

Figura 26. Gráficos dos resíduos calculados da curva analítica para a determinação de Sulfametoxazol.	60
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades químicas do DCF	4
Tabela 2. Propriedades químicas do SMZ	6
Tabela 3. Características químicas da Rodamina-B[13].....	8
Tabela 4. Procedimentos analíticos descritos para a determinação de DCF	12
Tabela 5. Procedimentos analíticos descritos para a determinação de SMZ.....	15
Tabela 6. Tabela de análise de variância para a curva analítica.....	40
Tabela 7. Figuras de mérito do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de diclofenaco.....	41
Tabela 8. Análise de variância da curva analítica	43
Tabela 9. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de diclofenaco com Rodamina-B	44
Tabela 10. Recuperação de diclofenaco em amostra de água no ponto C.....	45
Tabela 11. Recuperação de Diclofenaco em amostra de águas naturais no ponto D.....	46
Tabela 12. Recuperação de Diclofenaco em amostra de águas no ponto A.....	47
Tabela 13. Estudo de recuperação de Diclofenaco em amostra naturais no ponto B	48
Tabela 14. Parâmetros de confiabilidade analítica de procedimentos descritos na literatura para determinação de diclofenaco em amostras de águas naturais.....	49
Tabela 15. Análise de variância da curva analítica para determinação de sulfametoxazol ...	55
Tabela 16. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfametoxazol com Rodamina-B.....	56
Tabela 17. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra A).....	57
Tabela 18. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra B).....	57
Tabela 19. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra C)	57
Tabela 20. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra D)	58
Tabela 21. Análise de variância da curva analítica obtida para a determinação de Sulfametoxazol empregado Rodamina como padrão interno	61
Tabela 22. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Sulfametoxazol utilizando Rodamina-B como padrão interno	61
Tabela 23. Recuperação de diclofenaco na amostra de água (Amostra C).....	62
Tabela 24. Recuperação de diclofenaco em amostra de água (amostra D)	62

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Impacto Ambiental.....	1
1.2	Aspectos Gerais do Diclofenaco.....	3
1.3	Sulfametoxazol.....	4
1.4	Aspectos Gerais do Sulfametoxazol.....	5
1.5	Método do Padrão Interno.....	6
1.6	Aspectos Gerais da Rodamina-B.....	7
1.7	Procedimentos Analíticos para a Determinação de Diclofenaco.....	8
1.8	Procedimentos Analíticos para a Determinação de Sulfametoxazol.....	13
1.9	Espectroscopia como Método de Análise Química.....	16
1.10	Espectrofluorimetria.....	18
1.11	Validação de métodos analíticos.....	19
1.11.1	Determinação da linearidade.....	20
1.11.2	Faixa de Trabalho.....	22
1.11.3	Limite de Detecção.....	22
1.11.4	Limite de Quantificação.....	23
1.11.5	Exatidão.....	24
1.11.6	24	
1.11.7	Estudo da Recuperação do Analito.....	25
2	Objetivo.....	26
2.1	Objetivos Gerais.....	26
2.2	Objetivos Específicos.....	26
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1	Equipamentos.....	27
3.2	Reagentes e Soluções.....	27
3.3	Amostragem.....	28
3.4	Obtenção dos espectros de emissão dos analitos.....	32
4	Resultados e discussões.....	33
4.1	Caracterização das amostras de águas coletadas.....	33
4.2	Desenvolvimento de um procedimento para determinação de diclofenaco em amostras de águas.....	35
4.2.1	Matriz e Emissão e Excitação do Diclofenaco e da Rodamina-B.....	35
4.2.2	Avaliação da influência do pH sobre a emissão de fluorescência do diclofenaco.....	36

4.2.3	Curva analítica do procedimento proposto para a determinação de diclofenaco em amostras de águas	38
4.2.4	Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica.....	41
4.2.5	Avaliação do emprego da Rodamina-B como padrão interno no procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de diclofenaco em amostras de águas	41
4.2.6	Estudo da recuperação de diclofenaco nas amostras de águas empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto	45
4.2.7	Estudo da recuperação de diclofenaco nas amostras de água empregando o procedimento proposto com Rodamina-B.....	47
4.3	Desenvolvimento de um procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de sulfametoxazol em amostras de águas	49
4.3.1	Matriz e emissão e excitação do Sulfametoxazol.....	49
4.3.2	Avaliação da influência do pH sobre a emissão de fluorescência do sulfametoxazol	50
4.3.3	Curva analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfametoxazol em amostras de águas.....	52
4.3.4	Recuperação do Sulfametoxazol em Amostras de Águas utilizado o Procedimento Espectrofluorimétrico Proposto.....	56
4.3.5	Avaliação do Emprego da Rodamina-B como Padrão Interno no Procedimento Espectrofluorimétrico para a Determinação de Sulfametoxazol em Amostras de Águas ..	58
4.3.6	Avaliação da Recuperação de Sulfametoxazol em Amostras de Águas Empregando o Procedimento Espectrofluorimétrico Proposto Utilizando a Rodamina-B Como Padrão Interno	61
5	Conclusões.....	64
6	Referências bibliográficas	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impacto Ambiental

As atividades antropológicas sempre causaram algum tipo de impacto na flora ou na fauna. Com a revolução industrial de 1840, estas atividades foram potencializadas de forma que suas conseqüências não poderiam ser mais ignoradas, pois as mesmas não ficaram restritas apenas a regiões de grande concentração urbana ou industrial. Ao contrário, se tornaram perceptíveis e até inconvenientes para habitantes de comunidades distantes dos grandes centros. Logo, conseqüentemente gerou um aumento de seus resíduos químicos, descartados de forma inadequada e se tornaram inconvenientes e prejudiciais a saúde humana.

Um estudo de rotina na Suíça visando a detecção de pesticidas nas águas naturais encontrou as substâncias em concentrações em nível de traços. Isto levou investigações mais detalhadas como a pesquisa de GIGER et al.[1] sobre ocorrência de traços de medicamentos. Neste estudo, ficou demonstrado que apesar de alto consumo de antibióticos na área veterinária, estes fármacos não foram identificados nas amostras coletadas dentro área urbana. Porém, estudos detectaram a presença de substâncias com atividade biológica de uso humano nas águas naturais e no lodo de esgoto. Este fato levou a Suíça a proibir o uso de lodo de esgoto para agricultura desde Janeiro de 2003.

A partir deste estudo, a introdução de agentes químicos tornou-se uma preocupação, pois os agentes patológicos poderiam se tornar mais resistentes aos

medicamentos pela ingestão indevida de fármacos pelos seres humanos ao consumir alimentos que estejam contaminados.

Dentro disso, o aumento do crescimento contínuo do consumo de fármacos pela população pode ter conseqüências ainda desconhecidas, podendo causar impacto no ambiente aquático[1].

Podemos encontrar indícios, como verificados pelo trabalho de OAKS et al. [2] no qual demonstrou que o declínio da população de abutres no Paquistão estava relacionada devido problemas de insuficiência renal. Os problemas da população estava correlacionada com a presença de um anti-inflamatório. Nesta investigação, cerca de 260 necropsias foram realizadas, sendo que em 85% das análises foram diagnosticadas com gota visceral (formação de sais insolúveis de ácido úrico). Esta enfermidade esta relacionada com insuficiência renal, para descobrir o patógeno foi efetuada nova uma necropsia, mais detalhada, selecionando um novo subconjunto de espécimes, indivíduos que estavam mortos menos de 24 horas, neste novo diagnóstico foi concluído que mais de 65% tinha a presença do antiinflamatório diclofenaco. Os demais indivíduos estavam abaixo do limite de detecção do método analítico.

A introdução de fármaco em um bioma tem demonstrado diversas conseqüências, que podem variar desde um leve impacto a uma grave redução de uma espécie. Este fato pode ocasionar prejuízos incalculáveis, pois, uma espécie pode estar intimamente ligada com uma cadeia de atividade bióticas e abióticas, com isso poderá trazer um desequilíbrio no ecossistema.

Este novo tipo de poluente tem diversas fontes e pode ter origem em diferentes atividades de indústrias químicas, farmacêuticas ou devido ao seu consumo pela população. Sua origem pode também ocorrer pelo descarte dos

fármacos nos esgotos domésticos. A administração do fármaco no uso terapêutico humano e veterinário leva ao despejo dos metabólitos desses fármacos eliminados pelos organismos[3].

A classe de fármacos mais utilizados no mundo são os antiinflamatórios, no qual o mais comum é o diclofenaco. O consumo global de tal medicamento é estimado em 940 toneladas por ano[4], sendo que o Brasil ocupa a sétima posição mundial de consumo de medicamentos em geral [5].

1.2 Aspectos Gerais do Diclofenaco

Diclofenaco (DCF) é anti-inflamatório não-esteroidal da classe dos não seletivo coxs. Suas principais funções são atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética. Derivado do ácido fenilacético apresenta a forma molecular $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ (Figura 1). O DCF é utilizado principalmente na forma de sal potássio ou sódico e pode ser administrado por via oral, intramuscular, retal ou tópica.

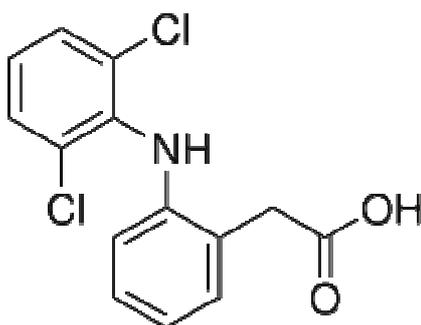


Figura 1. Estrutura molecular DCF.

Algumas propriedades químicas do diclofenaco estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades químicas do DCF

Propriedades físico-químicas	Valor
Massa molar (g mol^{-1})	296,15
Solubilidade em água (g L^{-1} a 25°C)	23,70
pK_a (25°C)	4,10 a 4,50
Log K_{ow} (25°C)	4,50 a 4,80

Verifica-se que o diclofenaco apresenta baixa solubilidade em água, está totalmente dissociado em pH acima de 4,5 e apresenta propriedades lipofílicas.

1.3 Sulfametoxazol

Segundo GOLAN [6], os antibióticos são fármacos que eliminam as bactérias por meio da inibição da síntese da parede celular das bactérias. Sua ação está localizada na etapa de síntese protéica do microorganismo, impedindo o crescimento das bactérias. A eliminação dos microrganismos está baseada na ação do sistema imunológico do hospedeiro para eliminar as bactérias, levando ao efeito bacteriostático da substância.

Sulfametoxazol faz parte do grupo de antibióticos com ação bacteriostática (sulfonamidas), interferindo no processo de multiplicação das bactérias, devido sua semelhança estrutural com ácido para-aminobenzóico (PABA); quando a bactéria for sintetizar o ácido fólico a partir PABA do hospedeiro, o fármaco inibe esta etapa, incapacitando a produção de novas bactérias.

Somente microorganismos que sintetizam o seu próprio ácido fólico é que são inibidos pelas sulfonamidas. Por essa razão, as células animais não são

afetadas pelas sulfonamidas uma vez que elas utilizam ácido fólico pré-formado e não são capazes de sintetizá-lo. Por outro lado, as bactérias que forem capazes de utilizar precursores do ácido fólico ou ácido fólico pré-formado, também não serão afetadas pelas sulfonamidas, sendo por isso resistentes a este grupo de fármacos.

1.4 Aspectos Gerais do Sulfametoxazol

Sulfametoxazol (SMZ), 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida, apresenta forma molecular $C_{10}H_{11}N_3O_3S$. Sua estrutura química é apresentada na Figura 2.

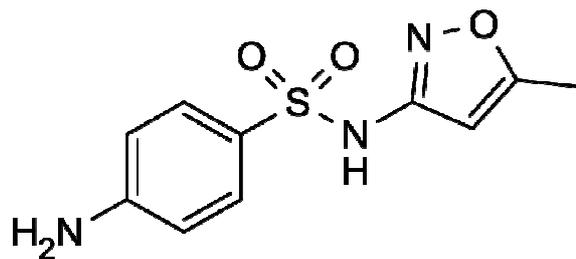


Figura 2. Estrutura do SMZ.

Algumas propriedades físico-químicas do SMZ estão apresentadas na Tabela 2. Podemos verificar que o fármaco apresenta elevada solubilidade em água, propriedade hidrofílica e está totalmente dissociada em pH acima de 6.

Tabela 2. Propriedades químicas do SMZ

Propriedades físico-químicas	Valor
Massa molar (g mol^{-1})	253,28
Solubilidade em água (mg L^{-1} 25°C)*	610
pK _a (25°C)	1,6 e 5,7
Log K _{ow} (25°C)*	0,89

1.5 Método do Padrão Interno

Quando um resultado de um procedimento não satisfaz plenamente algum requisito que o analista considera relevante; emprega-se procedimentos de contorno, são processos da química analítica consagrado, visando refinar o processo ou mesmo minimizar erros randômicos e sistemáticos. Neste trabalho, o procedimento escolhido para atenuar possíveis interferências foi aplicação do método do padrão interno.

Como citado anteriormente, para melhorar o coeficiente correlação linear uma estratégia foi aplicação do padrão interno; é um procedimento de atenuação de erros aleatórios e sistemáticos durante o processo de medição[7, 8]. Para empregar este método, a substância que será o padrão deve suprir algumas condições: apresentar características similares ao analito, mas que, possa ser quantificado separadamente, que o seu comprimento de ondas de emissão sejam distintos. Neste estudo foi selecionado um padrão que tenha propriedade fluorescente, mas que tenha a característica de absorver e emitir a radiação em comprimentos de ondas distintos do analito.

O método consiste adicionar uma quantidade desta substância nas soluções padrões do analito e nas amostras, observando que a concentração do padrão deve

ser constantes e iguais a todas as soluções. O cálculo é realizado considerando a relação dos sinais resposta do analito e do padrão, que estão nas mesmas condições experimentais durante a medição[8-10].

A correlação será feita com a expressão abaixo:

$$\text{correlação} = \text{concentração} \times \frac{\text{senal}_{\text{analitico}}}{\text{senal}_{\text{padrao interno}}}$$

Para aplicação desta metodologia, aplicado ao diclofenaco e sulfametoxazol, foi selecionado a Rodamina-B como padrão interno, um fluoróforo com as características fluorescentes conhecidas.

1.6 Aspectos Gerais da Rodamina-B

Rodamina é um nome de uma família de substâncias orgânicas que são nomeados de fluoronas e apresentam formula molecular $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ [11]. A Rodamina-B e seus derivados são conhecidos nas metodologias baseadas nos processos de emissão de radiação, devido seu alto rendimento quântico[12]. Na

Tabela 3 estão apresentadas algumas características físico-químicas da Rodamina-B.

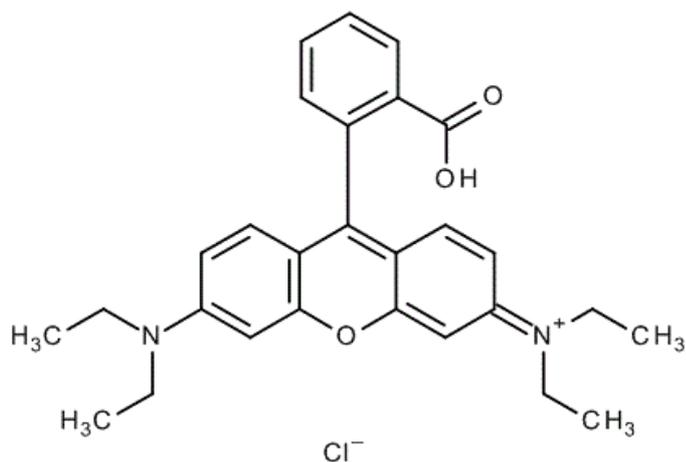


Figura 3. Estrutura molecular da Rodamina-B.

Tabela 3. Características químicas da Rodamina-B[13]

Propriedades físico-químicas	Valor
Massa molar (g mol^{-1})	479,02
Solubilidade em água (g L^{-1} a 20°C)	15
pK_a (20°C)	3,7
Log K_{ow} (20°C)	1,95

1.7 Procedimentos Analíticos para a Determinação de Diclofenaco

Existem inúmeros procedimentos para determinação DCF em diversos tipos de amostras: biológicas[14, 15], ambientais[16-20] e farmacêuticas [21-23]. Entre os procedimentos descritos, aqueles que apresentam melhor limite de detecção são aqueles que utilizam a Cromatografia Líquida e a Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massa. Estes métodos são de alto custo, além de requerer preparo de amostras morosos e analistas qualificados.

Recentemente, procedimentos analíticos empregando a espectrometria de emissão molecular têm sido descritos para a quantificação de substâncias com

atividades biológicas em diversos tipos de amostras. Algumas vantagens destes procedimentos são o baixo limite de detecção e uso de menor quantidade de solventes.

Alguns procedimentos analíticos descritos para a determinação de diclofenaco estão apresentados na Tabela 4.

ARANCIBIA et al.[21] desenvolveram um procedimento espectrofluorimétrico para determinação de diclofenaco em produtos farmacêuticos. Os autores utilizaram o complexo formado entre α -ciclodextrina e diclofenaco em meio aquoso para a quantificação do fármaco. Neste trabalho, uma faixa linear de 0 a 5 $\mu\text{g/mL}$ e recuperação entre 99 a 101 % foram obtidos.

KOUSOUBA et al.[24] determinaram diclofenaco em amostras de águas residuais empregando a derivatização com brometo de pentafluorbenzila e a quantificação por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa. As amostras foram previamente filtradas, misturadas com metanol e ácido clorídrico. A extração em fase sólida foi efetuada aplicando-se a amostra em cartucho C_{18} , previamente condicionado com acetona, metanol e água destilada. Após a percolação da amostra no cartucho, a eluição foi efetuada com metanol. O eluato obtido foi misturado com o padrão interno ácido 2,4-diclorobenzóico, obtida em metanol. A derivatização do eluato foi obtida com o emprego de uma solução de brometo de pentafluorbenzila (2% tolueno) e usando trietilamina como catalisador. Em seguida, o eluato derivatizado foi seco sob fluxo de nitrogênio e depois dissolvido em tolueno. Diclofenaco derivatizado foi determinado por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa com seletor de íons (SIM). Os autores obtiveram uma recuperação de 76% nesta matriz. A faixa linear da curva analítica variou de 10 a 2000 ng/L. As determinações de diclofenaco em águas

foram realizadas, encontrando uma faixa de concentração entre 12 a 560 ng/L nos efluentes analisados.

JADHAV et al.[22] determinaram diclofenaco em produtos farmacêuticos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e detector de arranjo de fotodiodo. O gradiente de eluição empregado na fase móvel envolveu soluções de dihidrogênio fosfato de sódio e metanol, com uma taxa constante de 1 mL min⁻¹. As amostras foram prensadas e solubilizadas em uma mistura de água e metanol, que permaneceram por 20 min no banho de ultra-som. Em seguida, passou por um filtro de nylon[®] de 0,45 µm. No primeiro procedimento, sua recuperação foi entorno de 99,5% com uma faixa linear 24,91 a 74,72 µg mL⁻¹. No segundo procedimento, a recuperação foi entorno de 100,4% com uma faixa linear de 0,44 a 13,19 µg mL⁻¹

FERNÁNDEZ et al.[19] determinaram diclofenaco de sódio em produtos farmacêuticos empregando espectrofotometria de absorção de radiação ultravioleta em fase sólida imobilizada em uma resina aniônica. As amostras foram dissolvidas em uma solução metanólica, que apresentou estabilidade por até quinze dias a 5°C. As medidas foram realizadas utilizando solução tampão fosfato de potássio (pH 7,0). As absorbâncias foram obtidas no comprimento de onda de 281 nm. O procedimento apresentou uma curva analítica com faixa linear entre 0,4 a 5,75 µg mL⁻¹. As recuperações de diclofenaco variaram entre 99,6 a 103% nas amostras analisadas.

MATIN et al.[16] propuseram um procedimento simples utilizando a espectrofotometria UV-Vis para determinar diclofenaco em formulações farmacêuticas. Foram selecionados três tipos de amostra e tratadas conforme as especificidades de cada fármaco. As amostras foram maceradas, filtradas, dissolvidas, diluídas e adicionadas com uma solução de ácido nítrico (63% v/v). Os

sinais foram obtidos no comprimento de onda de 380 nm. O procedimento apresentou uma curva analítica com faixa linear variando entre 1 a 30 mg L⁻¹. Os resultados obtidos na determinação de diclofenaco nas amostras comerciais com o procedimento proposto não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos empregando o método oficial. Uma recuperação média de 101,2% entre as amostras foram obtidas utilizando-se o procedimento proposto.

Tabela 4. Procedimentos analíticos descritos para a determinação de DCF

Amostras	Tratamento de amostra	Método	Linearidade/mol L ⁻¹	Recuperação/%	Referência
Farmacêutica	Extração de fase sólida	RP-HPLC	8,41x10 ⁻⁵ a 2,52x10 ⁻⁴ 1,49x10 ⁻⁶ a 4,45x10 ⁻⁵	99,3 101,5	[22]
Águas naturais	Extração de fase sólida	UHPLC	3,38x10 ⁻⁸ a 9,79x10 ⁻⁷	97,6 a 102	[14]
Urina	Sem Preparo de amostra	Voltametria	1,0 x10 ⁻⁸ a 1,0 x10 ⁻⁶	99,8	[17]
Águas naturais	Extração de fase sólida	HPLC- espectrofluorimetria	3,38x10 ⁻¹¹ a 3,71x10 ⁻⁹	56 a 97	[18]
Águas naturais	Extração de fase sólida	HPLC-DAD	1,01x10 ⁻⁸ a 4,05x10 ⁻⁶	102	[15]
Farmacêutica	Sem preparo de amostra	Espectrofotometria	3,38x10 ⁻⁶ a 1,01x10 ⁻⁴	ND	[16]
Urina	Sem preparo de amostra	Voltametria	5.0x10 ⁻⁶ a 6,0x10 ⁻⁴	ND	[23]
Farmacêutica	Sem preparo de amostra	Espectrofotometria	1,35x10 ⁻³ a 1,94x10 ⁻²	102 a 96	[19]
Farmacêutica	Extração líquido-líquido	FIA com detecção espectrofotométrica	8x10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻⁴	97 a 101	[20]
Águas naturais	Extração de fase sólida	CG-MS	3,38x10 ⁻¹¹ a 6,75x10 ⁻⁹	76	[24]
Farmacêutica	Sem preparo de amostra (α –ciclodextrina)	Espectrofluorimetria	0 a 1,69x10 ⁻⁵	99 a 100	[21]

RP-HPLC: reverse phase- high performance liquid chromatography; UHPLC: ultra high performance liquid chromatography; DAD: diode array detector; FIA: flow injections analysis; ND: não determinado.

1.8 Procedimentos Analíticos para a Determinação de Sulfametoxazol

Alguns procedimentos analíticos descritos para a determinação de sulfametoxazol estão apresentados na Tabela 5.

GARCÍA-GALÁN et. al.[25] determinaram 19 sulfonamidas em diferentes tipos de amostras de águas (efluentes, afluentes, subterrânea e de superfície). Neste trabalho, todas as amostras foram filtradas e passaram pelo processo de extração de fase sólida. Depois do preparo de amostra, o sulfametoxazol foi determinado utilizando um cromatógrafo líquido com detector de MS-MS.

SUN et. al.[26] determinaram sulfametoxazol e outros fármacos da classe sulfonamidas em águas residuais utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de UV-Vis. Aplicou-se um procedimento de coprecipitação com solução de óxido de ferro para formação de micelas e durante a reação usou uma solução de hidróxido de sódio, depois empregou a extração de fase sólida.

HERRERA-HERRERA et. al.[27] determinou antibióticos da classe das sulfonamidas utilizando UHPLC-DAD, comparando dois procedimentos de preparo de amostras. Empregando-se nanotubos de carbono magnético e não magnético como sorvente para a extração de fase sólida dispersiva. Neste trabalho foi preparado um solução contendo cloreto de ferroso, clorato de férrico e ácido clorídrico misturado com hidróxido de amônia colocado para agitar durante 30 min, a 60°C em atmosfera inerte e depois arrefecer à temperatura ambiente durante 40 min. As nanopartículas magnéticas e

separado por imã, e lavado com água e etanol e seco a 60°C por 24 h. Nos nano tubo de carbono não magnéticos foram adicionado uma solução enriquecida com antibióticos e metabólicos dos sulfonamidas ajustados em pH 6,0 introduzida em um frasco contendo adsorventes, após uma agitação intensa foi transferida para uma coluna com duas cerâmicas PTFE com coletor a vácuo. Em seguida, percolou por uma coluna de extração de fase sólida retendo os analitos. A eluição foi realizada utilizando solução de metanol. O eluato foi evaporado até 40°C com pressão de 200 mbar o resíduo seco foi redissolvido em água filtrou-se a 0,20 micrometro e injetado no sistema cromatográfico.

CASTIGLIONI et. al.[28] determinaram sulfametoxazol e outras substâncias ativas em amostras de águas de esgoto, usando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplado ao espectrômetro de massa. A amostra foi diluída em metanol e percolada em um cartucho C18. As recuperações do sulfametoxazol nas amostras avaliadas ficaram ao redor de 65%, indicando certa interferência da matriz de amostra.

LIN et. al.[29] determinaram sulfametoxazol e outras sulfonamidas em amostras de águas. Utilizaram a técnica micro-extração líquida-líquida-líquida combinado com a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis.

Tabela 5. Procedimentos analíticos descritos para a determinação de SMZ

Amostras	Tratamento de amostra	Método	Linearidade/mol L⁻¹	Recuperação/%	Ref.
Águas naturais	MMHSPE	HPLC-UV	3,95x10 ⁻⁷ a 3,95x10 ⁻⁵	70,0 a 84	[26]
Águas naturais	LLLME	HPLC-UV	3,95x10 ⁻⁹ a 1,97x10 ⁻⁶	91,1 a 104	[30]
Água ultra pura Água ¹ Água ^{2*}	dSPE	UHPLC-DAD	3,87x10 ⁻⁷ a 3,95x10 ⁻⁶	80,0 a 104	[31]
Afluente Efluente Subterrânea Superficial	Extração de fase sólida	SPE-LC-MS/MS	3,95x10 ⁻¹⁴ a 3,09x10 ⁻¹¹	75,0 a 125	[25]
Água de Torneira Água mineral Águas naturais	Extração de fase sólida	CE - UV	6,04x10 ⁻⁹ a 3,95x10 ⁻⁷	88,6 a 105	[32]
Água mineral Águas naturais	Micro-extração líquido-líquido	UHPLC-DAD	1,97x10 ⁻⁸ a 3,95x10 ⁻⁶	93,0 a 107	[31]
Água de Torneira Água de piscicultura Águas naturais	Com preparo de amostra poli(propileno glicol) 400	HPLC	9,87x10 ⁻⁹ a 9,87x10 ⁻⁷	96,0 a 101	[33]
Farmacêuticas	Sem tratamento	Espectrometria	1,18x10 ⁻⁶ a 5,92x10 ⁻⁵	101 e 102	[34]
Águas naturais	Extração de fase sólida	HPLC-MS-MS	3,95x10 ⁻⁹ a 1,18x10 ⁻⁴	65	[28]

UHPLC: ultra high performance liquid chromatography; DAD: diode array detector; ¹ muito baixo conteúdo mineral; ² baixo conteúdo mineral; LLLME: liquid-liquid-liquid microextraction; CE: capillary electrophoresis

1.9 Espectroscopia como Método de Análise Química

A espectroscopia é o método que estuda a interação da radiação eletromagnética com diversos estados da matéria (sólido, líquido ou gasoso) levando dados físico-químicos através da transmissão, absorção ou reflexão da radiação. Na Figura 4, são apresentadas as faixas de comprimentos de ondas de radiações eletromagnéticas.

Quando a radiação interage com o objeto de estudo, determinada parte desta energia é absorvida e pode ser chamada de linhas espectrais (para átomos) ou bandas espectrais (para moléculas) dependendo de quanto de energia foi absorvida. Estas linhas/bandas espectrais que são a assinatura espectral do material. Estes fenômenos são demonstrados pelos espectros de absorção da substância ou elemento.

A luminescência é um fenômeno que ocorre quando há emissão de radiação eletromagnética. Os principais fenômenos são apresentados a seguir:

- **Fotoluminescência:** Estimulada com energia de uma radiação Ultra-violeta ou visível, comprimento aproximadamente de 200 a 400 nm e 400 a 750 nm.
 - **Fluorescência:** Luminescência instantânea da matéria após a excitação sem alteração do spin, com tempo de vida médio 10^{-12} a 10^{-9} s.
 - **Fosforescência:** Luminescência retardada da matéria após a excitação com alteração do spin, com tempo de vida médio de segundos até minutos dependendo da condições do sistema.

- **Quimiluminescência:** Luminescência resultante de uma reação química
- **Bioluminescência:** Luminescência promovida por uma reação bioquímica de algum organismo vivo.
- **Radioluminescência:** Luminescência gerada por radiações ionizantes, ondas eletromagnéticas gama ou radiações corpusculares alfa ou beta.
- **Triboluminescência:** Luminescência produzida excitando o sistema com energia mecânica. Ocorre quando um material sobre compressão ou fricção.
- **Termoluminescência:** Emissão de luz por meio de aquecimento dos minerais em uma faixa de temperatura de 50 a 475 °C, sendo inferior a temperatura de incandescência.
- **Eletroluminescência:** Luminescência provocada por pela excitação com energia de um campo elétrico.
- **Magnetoluminescência:** Luminescência provocada pela excitação com energia de um campo magnético.
- **Sonoluminescência:** Luminescência produzida com energia ultra-sônica (frequência superior a 20 kHz).

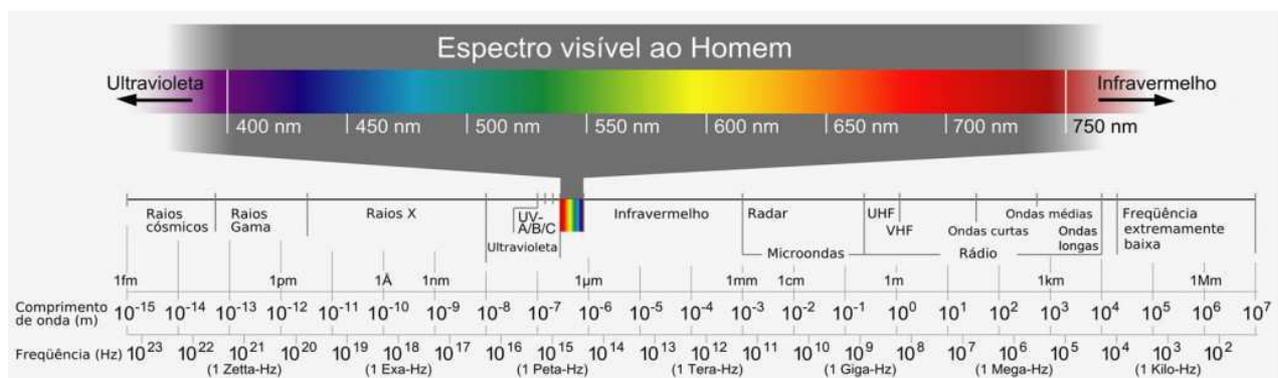


Figura 4. Faixa de comprimentos de ondas do espectro eletromagnético.

1.10 Espectrofluorimetria

Espectrofluorimetria é uma técnica analítica consagrada que permite a realização de determinações de variados analitos com grande sensibilidade e seletividade. Sua limitação está associada aos tipos de espécies analisadas. A espécie necessariamente precisa ser um fluoróforo, ou seja, a espécie química deve ter a capacidade de absorver energia e liberar radiação eletromagnética para ocorrer o fenômeno da fluorescência[35].

A técnica está estruturada no fenômeno da luminescência, que ocorre quando uma molécula é excitada, mudando a energia de seu estado fundamental para outro estado mais energético. Após retornar ao seu estado fundamental produz um espectro de emissão característico. Baseado nestes dados é possível analisar de forma quantitativa e qualitativa, devido, aos perfis de intensidades da emissão presente neste espectro.

Para uma melhor compreensão deste método é preciso lembrar que existe outro que tem o mesmo fundamento experimental que é a Fosforimetria, ambos trabalham com emissão de fótons devida a alteração de estados energéticos. A Fluorimetria e Fosforimetria estão fundamentadas na absorção de fótons por determinados grupos de fluoróforos que promovem a molécula a um estado excitado. A única diferença entre si é a natureza das transições eletrônicas. Quando não ocorre alteração do spin no elétron e existe a emissão radioativa no sistema singleto, S_1 para S_0 , chamamos de fluorescência, mas, quando há alteração do spin e ocorre a alteração de sistema, singleto para o tripleto, esta mudança de sistema é chamado de cruzamento inter-sistema, como podemos ver no diagrama de Jablonski (Figura 5), T_1 é um estado menos

energético que S_1 , neste estado a direção do spin é invertido outra vez voltando a posição original e volta para estado singleto fundamental com a emissão de fótons, esta emissão mais tardia é chamada de Fosforescência que pode chegar de segundo até minutos[35].

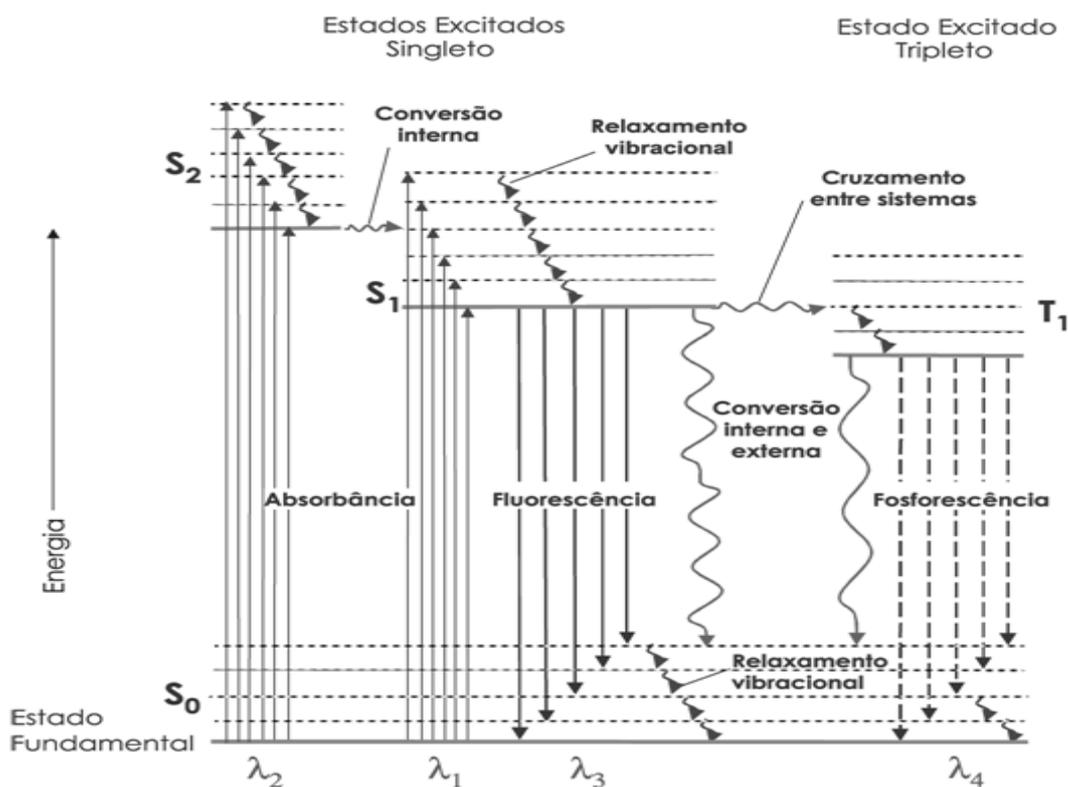


Figura 5. Diagrama de Jablonski.

1.11 Validação de métodos analíticos

Quando é apresentada uma nova proposta de procedimento analítico, existem parâmetros que devem ser aferidos e preenchidos, conforme a finalidade do método. Após realização de série de ensaios específicos, orientados a avaliar a sua confiabilidade, este procedimento faz parte do conjunto de avaliações denominado validação[36].

O processo de validação dependerá de órgão regulamentador, nacional ou internacional. No Brasil existem dois Órgãos fiscalizadores Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional Metrologia, Normalização e Qualidade Tecnologia (INMETRO). Estes órgãos regulamentam e disponibilizam guias para procedimento de validação em forma de resoluções, que tem poder de lei e devem ser obedecidas. Estes guias sugerem uma linha a ser seguida, mas são flexíveis o suficiente para adaptá-las conforme as necessidades do método proposto. Um fato que demonstra essas flexibilidades são as atualizações e publicações de novas resoluções sempre com intuito de aprimorar os guias[36].

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado **específico**. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado **seletivo**. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações[37].

1.11.1 Determinação da linearidade

Linearidade é a habilidade do procedimento analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se

conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$Y = a \times C + b$$

Onde:

Y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

C = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade do procedimento pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos sinais analíticos em função da concentração do analito, ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta de regressão como modelo matemático[37, 38]. A validade da equação que descreve a curva analítica deve ser avaliada por meio da análise de variância e gráficos de resíduos[38]. Apesar do coeficiente de regressão apresentar valores superiores a 0,99, erros aleatórios devem ser verificados e avaliados estatisticamente.

1.11.2 Faixa de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A faixa linear de trabalho de um método analítico é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o quantificação do analito. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico[37].

1.11.3 Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas[36]. No caso de métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na

relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação, em que: DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo de Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração[37, 39].

$$LD = \frac{k \times DP}{IC}$$

$$LD = \frac{3 \times DP}{IC}$$

Onde, k=3 no nível de confiança de 98%; k=2, no nível de confiança de 92,1%.

1.11.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas.

O limite de quantificação pode ser estabelecido por diferentes maneiras. O analista pode determinar o analito em soluções com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Outra maneira pode ser obtida pela equação:

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC}$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

Também pode ser determinado por meio do ruído[40]. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

1.11.5 Exatidão

1.11.6

A exatidão do método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método de análise e um método aceito como referência. Várias metodologias para a determinação da exatidão são empregadas [40]. Para a determinação do analito em produtos farmacêuticos, a exatidão pode ser obtida pela análise de uma amostra, na qual uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a determinação da exatidão pelo resultado do método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento[40].

1.11.7 Estudo da Recuperação do Analito

No estudo da recuperação, alíquotas diferentes da solução de referência do analito foram adicionadas em soluções contendo um volume de amostra. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados com a quantidade do analito adicionado na alíquota da solução padrão. Este estudo avalia a interferência da matriz da amostra sob o sinal analítico do procedimento espectrofluorimétrico proposto[40, 41].

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spiked test*). A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que aquela presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

A recuperação é calculada segundo[41]:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada;

C_3 = concentração adicionada.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolvimento de métodos analíticos com detecção espectrofluorimétrica para determinação de diclofenaco (DCF) e sulfametoxazol (SMZ) em amostras de águas superficiais.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudo das características espectrais do diclofenaco e sulfametoxazol em solução aquosa;
- Otimização de procedimentos analíticos empregando a espectrometria de emissão molecular;
- Validação de métodos espectrofluorimétrico para determinação do diclofenaco e sulfametoxazol em amostra de águas superficiais.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

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

As determinações de pH das soluções foram feitas em um medidor de pH marca HANNA conectado a um eletrodo de vidro combinado e sensor de temperatura em aço inox. O eletrodo de vidro foi previamente calibrado com o uso de soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

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

Os espectros de absorção molecular foram obtidos utilizando Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-Vis Cary, modelo 50 CONC (Varian), com cubeta de quartzo de 3,5 mL (caminho óptico 10 mm).

3.2 Reagentes e Soluções

A solução estoque de Diclofenaco $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada de Diclofenaco (Sigma, 99 % m/m de pureza) em água. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões de 10,00 mL, completando-se o volume com solução tampão adequado.

A solução estoque de Sulfametoxazol $2,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa apropriada de Sulfametoxazol (Sigma, 99 % m/m de pureza) em água e hidróxido de sódio ($50/50 \text{ v} \times \text{v}^{-1}$). As soluções de trabalho foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões de 5,00 mL, completando-se o volume com solução tampão adequado.

As soluções tampão de pH 4,0 e 5,0 foram preparadas pela mistura de solução de ácido cético glacial $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 99,7% $\text{v} \times \text{v}^{-1}$, densidade de $1,049 \text{ g / mL}$ a 25°C) e solução de acetato de potássio $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (Synth, 99% pureza). Para as soluções tampão de pH 6,0 até 8,0 utilizou-se a solução de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 99% pureza). O ajuste do pH destas soluções foram realizadas com a adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 98% de pureza). As soluções tampão de pH 9,0 e 10,0 foram preparadas com a mistura das soluções de cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 99% m m^{-1} de pureza), solução de ácido bórico (H_3BO_3) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma, 99% m m^{-1} de pureza) e solução de hidróxido de sódio (NaOH). Todos reagentes empregados foram de grau analítico.

3.3 Amostragem

As amostras de água utilizadas foram provenientes dos córregos Rego d'a Água e Água Boa, localizado dentro do perímetro urbano (Dourados/MS). Cada local de coleta foi nomeado por letra maiúscula e acompanha seus respectivas coordenadas geográficas (latitude e longitude) totalizando quatros locais de coletas, que serão descrito a seguir:

Ponto da Coleta	Localização Geográfica
A	22°15'30,49"S e 54°49'7,64"W
B	22°15'3,61"S e 54°49'36,32"W
C	22°13'41,07"S e 54°49'48,70"W
D	22°15'20,20"S e 54°49'11,83"W

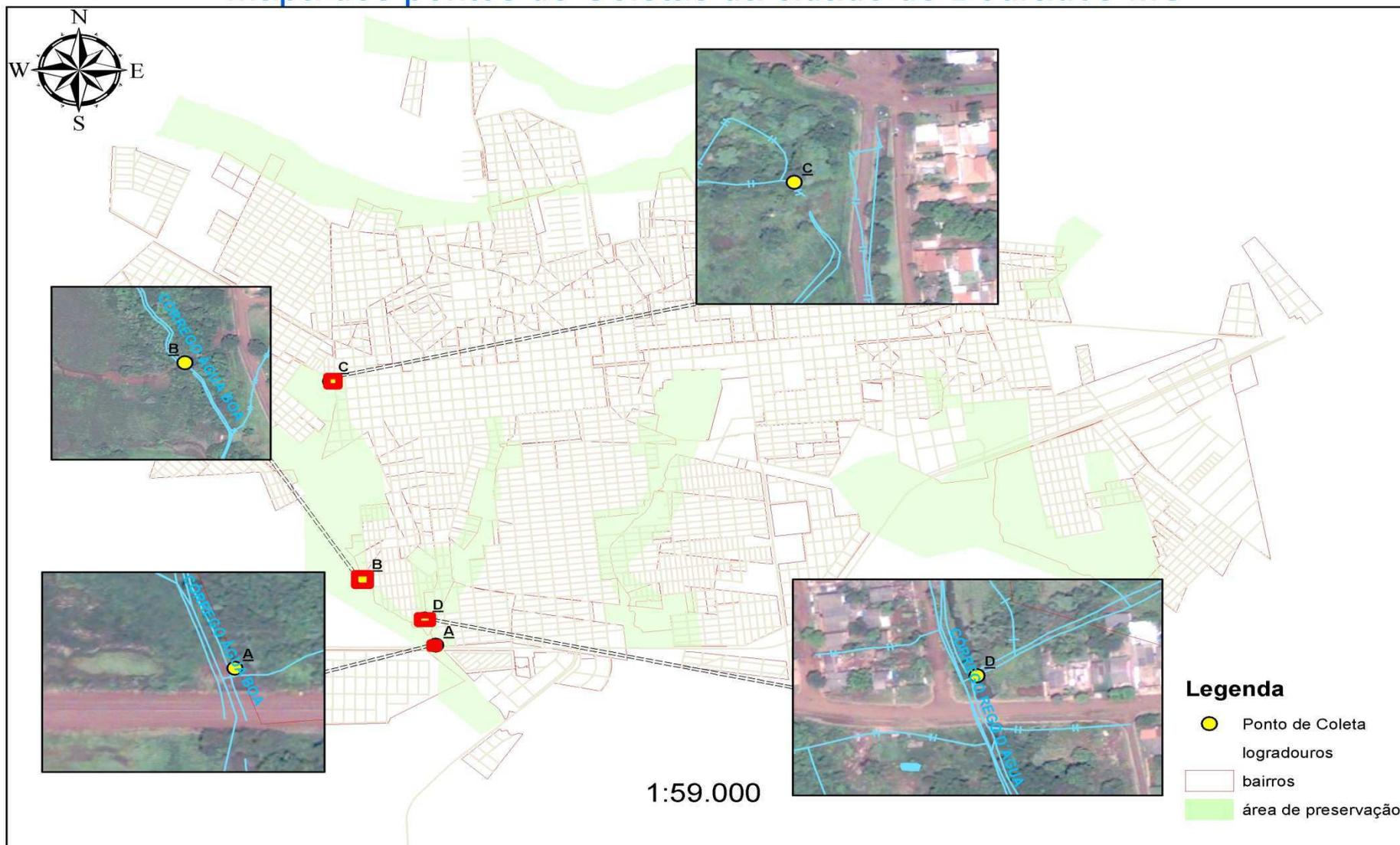
Ponto C é uma nascente que esta localizada dentro do parque Antenor Martins, os ponto A, B e D estão dentro de um bairro de alta densidade populacional na periferia da cidade, observando que todos os pontos de coleta estão em área de preservação ambiental.

Anteriormente a amostragem, as vidrarias foram deixadas em banho de solução de ácido nítrico 10 % $v \times v^{-1}$ durante 6 h, e após lavadas cinco vezes com água destilada. Todos os frascos âmbar e vidrarias utilizadas foram lavados com água corrente, antes de realizar a amostragem.

As amostras foram coletadas em frascos âmbar de 1,0 L, mantidas em ambiente isolado de fontes de luz e de calor durante o transporte e armazenamento. Para a retirada de partículas em suspensão das amostras, foi realizada uma filtração simples com filtro de membrana polietersulfônico (PES) com porosidade de 0,22 μm . O filtro de membrana suporta uma injeção

máxima de vácuo de 1,0 MPa (10 bar) a 25°C, possui uma área de filtração de 6 cm² e suporta uma temperatura máxima de 45°C. Após a filtração, a amostra foi armazenada em outro recipiente âmbar, durante todo o trabalho experimental.

Mapa dos pontos de Coletas da cidade de Dourados-MS



3.4 Obtenção dos espectros de emissão dos analitos

Os espectros de emissão foram obtidos com a janela de excitação com abertura de 5 nm e a janela de emissão de 10 nm. O espectrofluorímetro foi configurado no Módulo alto. A voltagem médio do detector empregada foi de 600 V, com filtros no automático, tanto excitação como na emissão. A varredura de excitação foi variada de 250 a 500 nm.

A matriz de excitação-emissão foi obtida com uma varredura de excitação entre 200 a 500 nm e emissão entre 200 a 700 nm, no módulo alto do espectrofluorímetro, estando os dois filtros no automático. A voltagem média do tubo fotomultiplicador foi de 600V com abertura da excitação em 5 nm e emissão em 10 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das amostras de águas coletadas

Realizando uma leitura de matriz de excitação-emissão na amostra ambiental (Figura 6), é possível observar fluorescência das amostras de águas em uma região entre 325 a 550 nm, quando excitadas entre 225 a 425 nm. Espectros semelhantes foram obtidos por HAO et. al.(2012)[45] sobre ácido húmicos e ácido flúvico. ZHANG et. al. (2011)[46] obtiveram uma matriz de excitação-emissão em uma região análoga.

A Figura 6 indica que existe semelhança espectral presente em todas as amostras de águas coletadas, apesar de serem coletadas em lugares distintos. Devido estas amostras estarem dentro do perímetro urbano, em regiões com alta atividade antropogênica, existe uma quantidade muito grande de fatores que podem alterar sua composição química, isso poderia explicar as diferentes intensidade de fluorescência. Observando que o ponto C está localizado em uma nascente dentro do parque com uma mata envolta do mesmo e tem uma intensidade muito diferente do ponto D, que está exposto em uma região habitada e com alta densidade populacional, enquanto que os pontos A e B estão dentro de uma área de conservação ambiental do município.

Esta fluorescência intrínseca da amostra poderá contribuir para uma interferência direta nos estudos realizados nos fármacos.

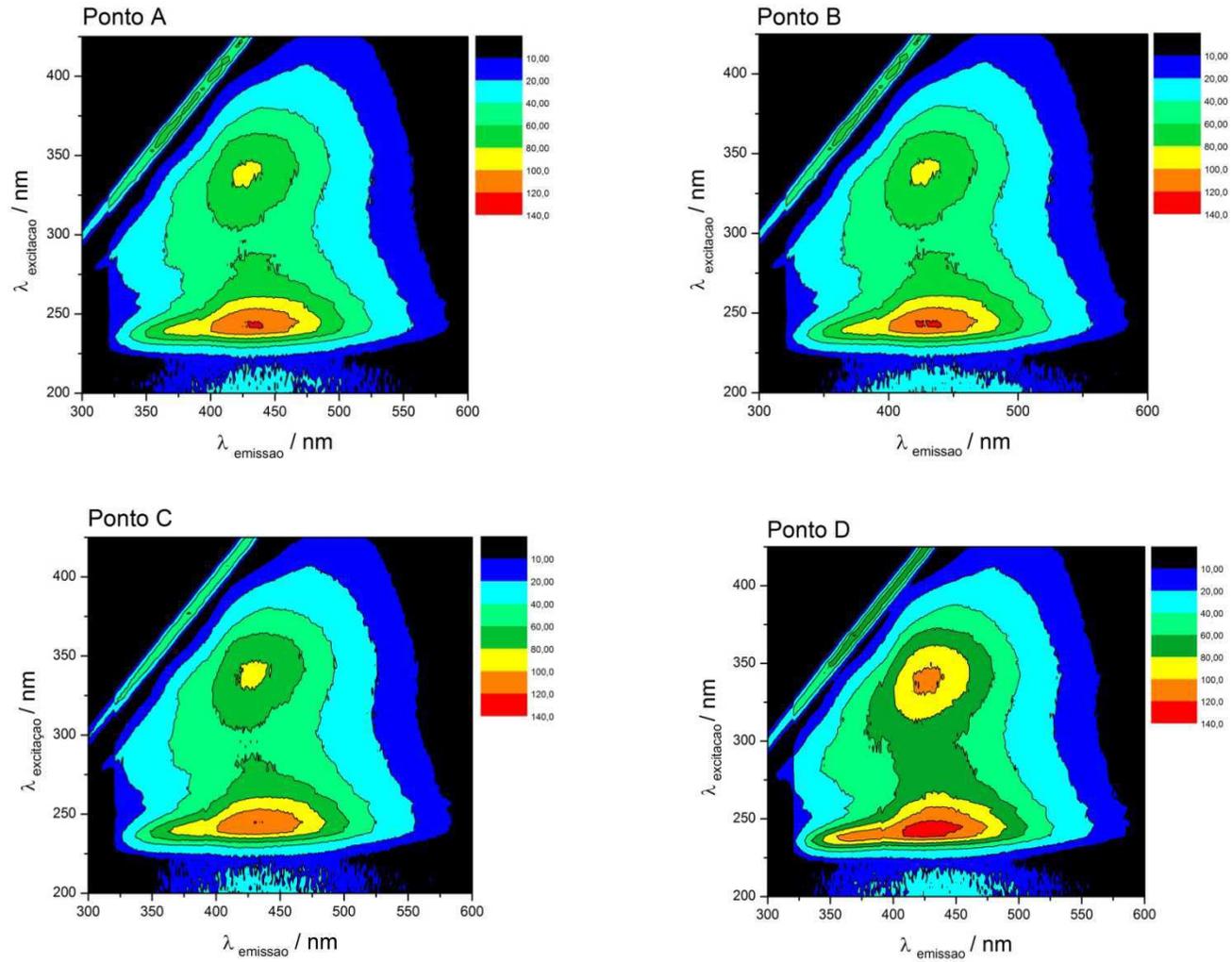


Figura 6. Matriz emissão e excitação das amostras avaliadas de águas dos córregos.

4.2 Desenvolvimento de um procedimento para determinação de diclofenaco em amostras de águas

4.2.1 Matriz e Emissão e Excitação do Diclofenaco e da Rodamina-B

A Figura 7 demonstra o comportamento de emissão do DCF em meio de solução tampão no qual podemos observar duas bandas de absorção nos comprimento de onda de 240 e 285 nm com uma banda com um máximo de emissão cerca de 370 nm.

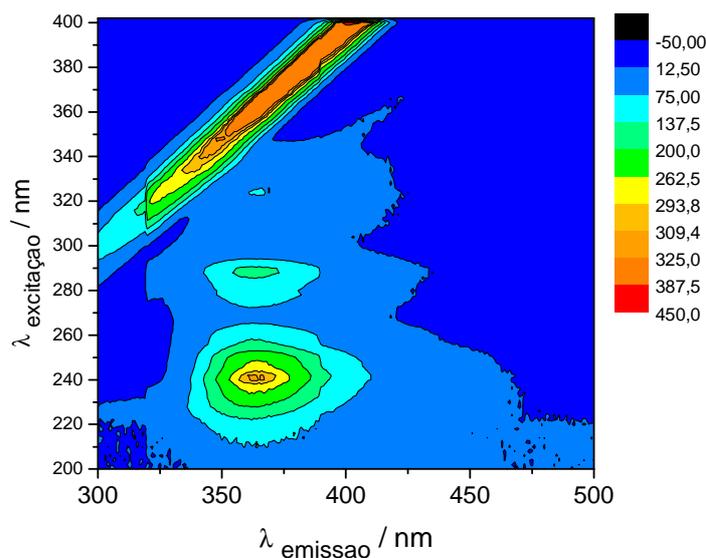


Figura 7. Matriz excitação e emissão de uma solução padrão de DCF 1×10^{-4} mol/L em solução tampão fosfato de potássio 0,10 mol/L (pH 6,0).

Na Figura 8 é possível observar o comportamento espectral da rodamina-B. Esta espécie é excitada em duas principais faixas espectrais, a ultra-violeta e a visível (ao redor de 550 nm). Podemos constatar que a

rodamina-B apresenta as características de um flúoroforo adequado para uso como padrão interno. Tem como objetivo verificar quais os comprimentos de ondas possíveis de excitação e se existem ondas compatíveis com analito de interesse, observando simultaneamente possível interferência na onda de emissão que possa sobrepor com emissão do analito.

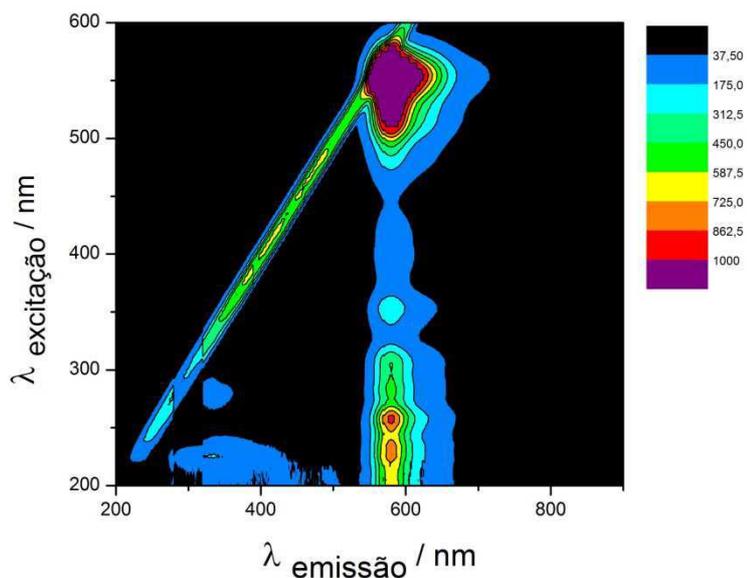


Figura 8. Matriz de excitação e emissão de uma solução padrão de Rodamina-B em meio aquoso.

4.2.2 Avaliação da influência do pH sobre a emissão de fluorescência do diclofenaco

A influência do pH do meio reacional sobre a intensidade de emissão (sinal analítico) da fluorescência foi estudado, avaliando entre a faixa de pH de 4,0 a 10,0 como mostra a Figura 9. Nesta figura, verifica-se que os espectros de soluções de diclofenaco em diferentes pH não apresentaram mudanças no mesmo comprimento de onda de emissão.

O efeito do pH na intensidade de emissão é verificada na Figura 10. A intensidade de emissão apresenta os maiores sinais de resposta no intervalo

pH 4,0 até 6,0. Para soluções com pH acima de 6,0 houve uma supressão do sinal analítico que chegou a ter um sinal quase 3 vezes menor que o sinal obtido na solução abaixo do pH 6,0. Nas soluções com pH alcalino, a solução com pH 9,0 apresentou maior intensidade de emissão. Desta forma selecionou-se o pH 6,0 , para o desenvolvimento dos trabalhos.

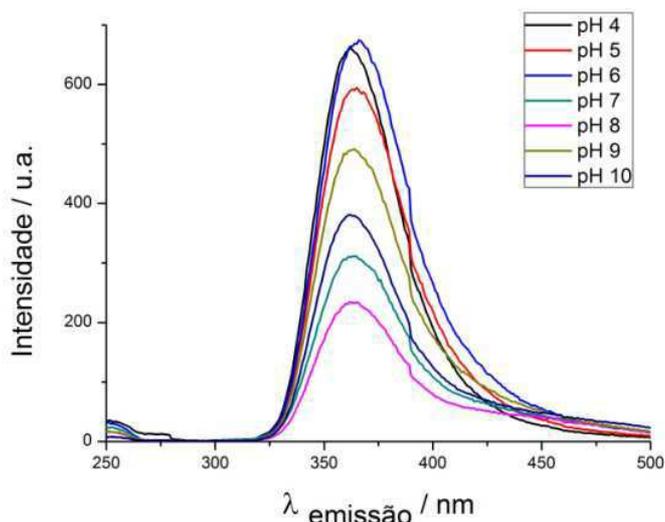


Figura 9. Influência do pH do meio nos espectros de emissão de solução padrão de DCF 1×10^{-4} mol/L. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm.

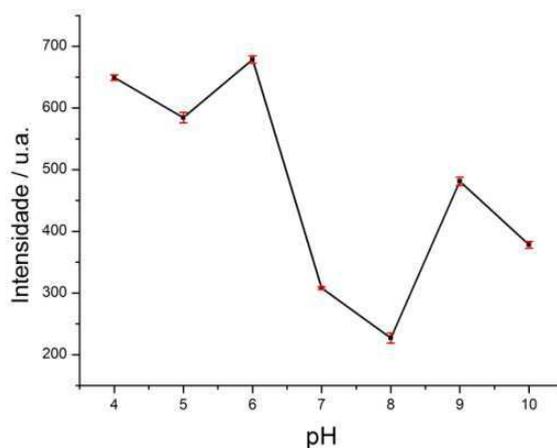


Figura 10. Influência do pH sobre a intensidade de emissão de uma solução padrão de DCF em diferentes soluções tampão, com força iônica controlada. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm ($n=2$).

4.2.3 Curva analítica do procedimento proposto para a determinação de diclofenaco em amostras de águas

Depois de otimizada o valor ideal de pH para obtenção dos espectros de emissão das soluções contendo diclofenaco, foram construídas as curvas analíticas do procedimento. Obtendo-se as intensidades de emissões de solução padrão de DCF em diferentes concentrações em 366 nm, depois de excitadas em 240 nm, foram avaliadas a linearidade da curva analítica. As concentrações avaliadas variaram de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L de DCF. A curva analítica foi construída empregando-se a intensidade de emissão vs concentração de DCF, conforme mostrada na Figura 11, no qual verificou-se um comportamento polinomial que resultou numa equação polinomial de ordem 2.

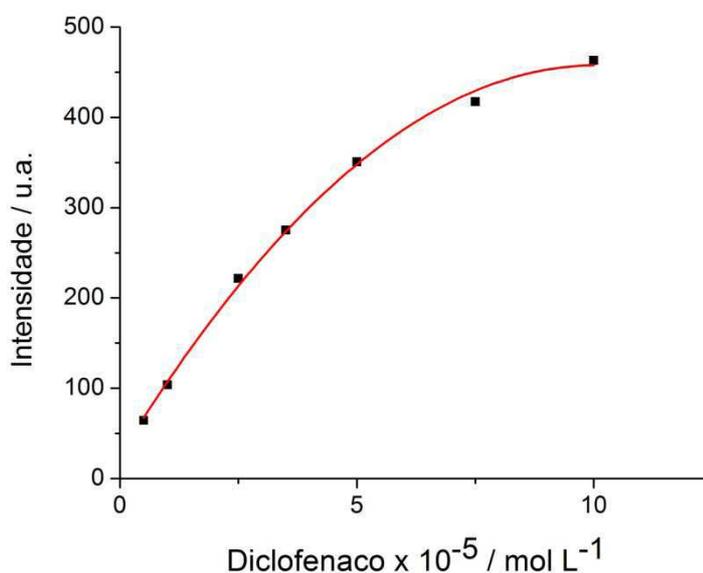


Figura 11. Curva analítica para a determinação de DCF. $\lambda_{\text{excitação}} = 240 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 366 \text{ nm}$ ($n=2$).

Na seqüência, uma curva analítica foi construída utilizando-se o log da intensidade versus o log da concentração de DCF. A curva analítica obtida desta maneira apresentou a forma linear entre as concentrações de $1,50 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e está mostrada na Figura 12. A curva analítica pode ser descrita pela equação $\log I = 0,73 (\pm 0,01) \times \log [DCF] + 5,69 (\pm 0,05)$, $r = 0,999$; onde I é a intensidade de emissão em 366 nm e [DCF] é a concentração de diclofenaco em 10^{-6} mol/L. A linearização da curva levou a obtenção de um modelo matemática linear com coeficiente de correlação mais adequado.

A reprodutibilidade do procedimento foi avaliada pela construção de outra curva no qual pode ser descrita pela equação $\log I = 0,68 (\pm 0,03) \times \log [DCF] + 5,45 (\pm 0,15)$; $r = 0,994$. Uma variação de 6,8% na inclinação das curvas analíticas foram observadas, indicando a viabilidade do procedimento.

Uma análise de variância foi realizada com os dados da curva analítica, para avaliar a significância da regressão. Como mostrado na Tabela 6, o alto valor de F (5.059,26) indica a existência de uma relação linear entre o log da Intensidade e o log concentração, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o recomendado.

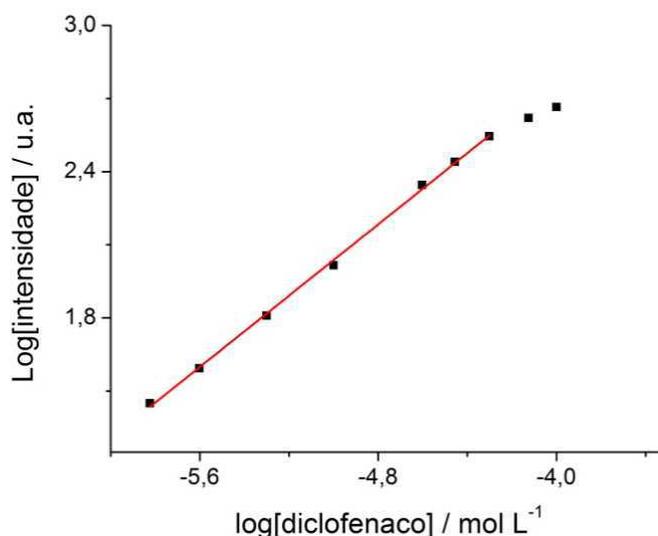


Figura 12. Curva analítica para a determinação de DCF em amostras de águas. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 366$ nm ($n=2$).

Tabela 6. Tabela de análise de variância para a curva analítica

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	1,106	1,10679	5059,26	$1,040 \times 10^{-8}$
Resíduo	5	0,0011	$2,18 \times 10^{-4}$		
Total	6	1,107			

Figura 13 apresenta o gráfico de resíduos calculados a partir da regressão obtida na curva analítica. Podemos verificar que, apesar do comportamento dos resíduos não estarem dispersos pela faixa de concentração, seus valores são baixos quando comparados a faixa de resposta da curva analítica.

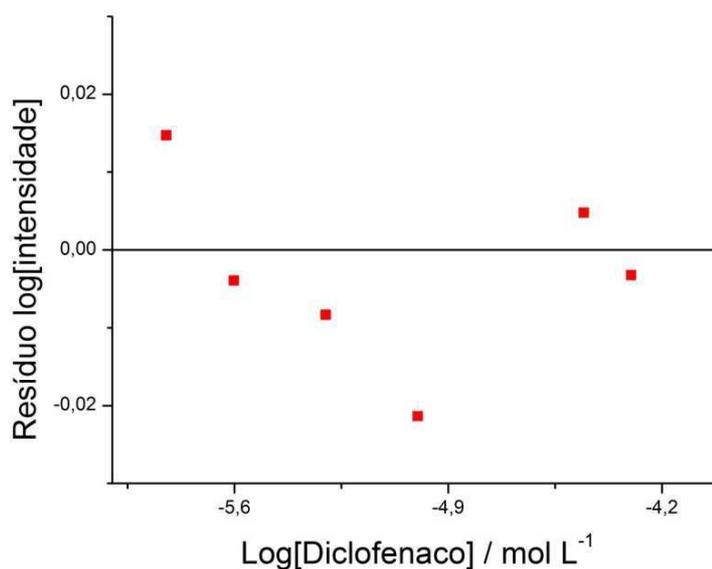


Figura 13. Gráficos de resíduos em função da concentração.

4.2.4 Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica

Os parâmetros de confiabilidade foram calculados e estão apresentados na Tabela 7. Os resultados foram determinados de acordo com requisitos estabelecidos dos guias de validação disponíveis.

Tabela 7. Figuras de mérito do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de diclofenaco.

Limite de Detecção ($3\sigma_{\text{branco}}/IC$)	$1,50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($444,21 \mu\text{g L}^{-1}$)
Limite de Quantificação ($10\sigma_{\text{branco}}/IC$)	$2,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Faixa Linear	$1,50 \times 10^{-6}$ a $7,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

4.2.5 Avaliação do emprego da Rodamina-B como padrão interno no procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de diclofenaco em amostras de águas

Nesta etapa, propôs-se o emprego da Rodamina-B com o padrão interno na determinação de diclofenaco em amostras de águas. Neste estudo, os parâmetros químicos e físicos otimizados anteriormente foram mantidos. Construiu-se uma curva analítica utilizando soluções padrão de diclofenaco em diferentes concentrações, onde foi adicionado a Rodamina-B $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ como padrão interno. Os espectros de emissão das soluções estão apresentados na Figura 14. Verifica-se nesta figura o aumento da emissão em

366 nm com o aumento da concentração de diclofenaco e a respectiva supressão da intensidade da Rodamina-B em 580 nm.

Como mostrado na Figura 15, este novo procedimento mostrou-se mais sensível, obtendo uma curva analítica descrita pela equação: $I = 1,77 \times 10^{-7} (\pm 0,03 \times 10^{-7}) \times [\text{DCF}] + 46,45 (\pm 9,89)$, $r = 0,999$; onde I é intensidade de emissão obtida em 366 nm ($\lambda_{\text{excit}} = 240$ nm), $[\text{DCF}]$ é a concentração de diclofenaco, em mol/L, e r é o coeficiente de regressão linear.

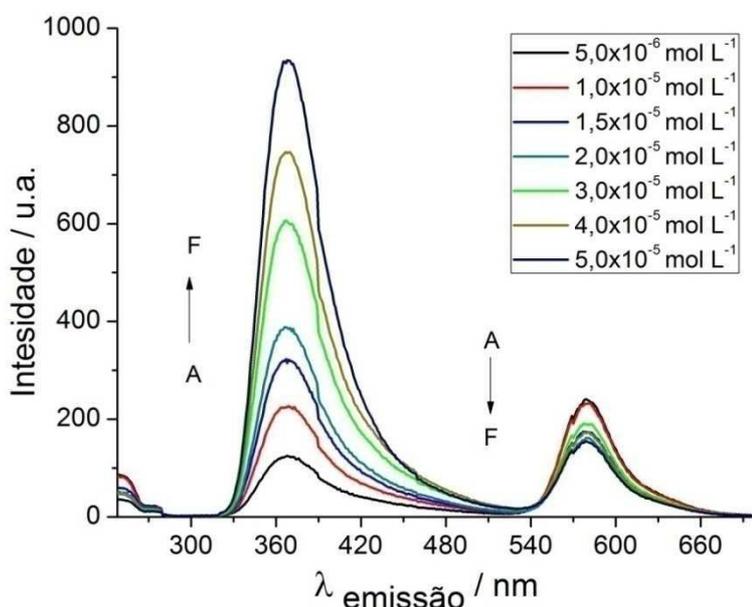


Figura 14. Espectros de emissão de soluções padrão de diclofenaco obtidos em meio contendo Rodamina-B 1×10^{-7} mol/L como fluoróforo e pH=6,0. $\lambda_{\text{excitação}} = 240$ nm.

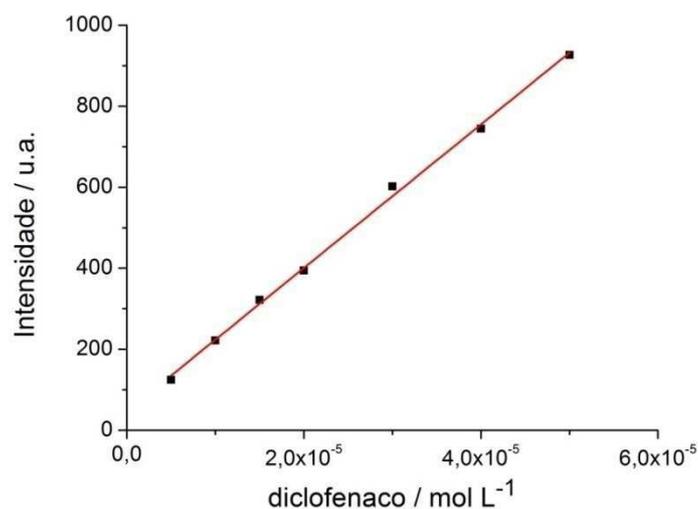


Figura 15. Curva analítica para a determinação de DCF, obtida o uso do padrão interno Rodamina-B. $\lambda_{\text{excitação}} = 240 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 366 \text{ nm}$ ($n=2$).

A regressão foi avaliada analisando-se a análise de variância (ANOVA). A análise de variância apresentou um F de 2.630 ($F_{(5,1; 0,05)}=6,61$). Como esse valor é superior ao valor recomendado, indica a existência de uma relação linear na curva analítica.

Tabela 8. Análise de variância da curva analítica

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob>F
Regressão	1	508812,9	50.8812,9	2.631,38	$5,32 \times 10^{-8}$
Resíduo	5	966,81	193,36		
Total	6	509.779,77			

$F_{(5,1; 0,05)}=6,61$.

O gráfico de resíduos foi obtido para verificar a distribuição dos pontos pela faixa de concentração estudada. Podemos verificar na Figura 16 que os

resíduos estão distribuídos ao redor da reta de regressão descrita pela equação da curva analítica.

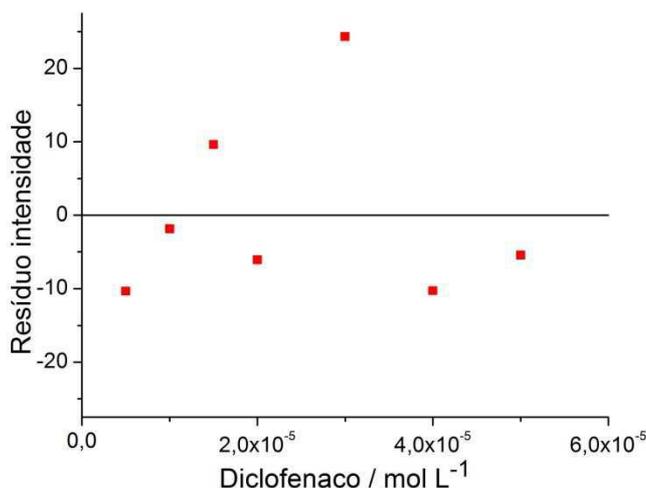


Figura 16. Gráfico de resíduos dos dados empregados na construção da curva analítica utilizando-se Rodamina-B.

Na Tabela 9 estão sumarizados os parâmetros de confiabilidade analítica para o procedimento proposto.

Tabela 9. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de diclofenaco com Rodamina-B

Limite de Detecção ($3\sigma_{\text{branco}}/IC$)	$2,74 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($811,42 \mu\text{g L}^{-1}$)
Limite de Quantificação ($10 \sigma_{\text{branco}}/IC$)	$3,86 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Faixa Linear	$5,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Comprimento de onda de emissão	366 nm

4.2.6 Estudo da recuperação de diclofenaco nas amostras de águas empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada utilizando o teste de recuperação. No estudo da recuperação do DCF são adicionadas três concentrações diferentes de solução de referência de DCF ($5,0 \times 10^{-6}$, $3,5 \times 10^{-5}$, e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) separadamente à soluções de amostras. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, são comparados com as concentrações adicionadas anteriormente. Os resultados do teste de adição e recuperação estão apresentados nas Tabela 10 e Tabela 11.

Para avaliar a exatidão do procedimento, aplicou-se o teste estatístico para verificar se as recuperações obtidas com as adições de padrão são estatisticamente diferentes de 100%. Analisando as recuperações da amostra C, verificou-se que a recuperação média é estatisticamente igual a 100%, no nível de confiança de 95%

Tabela 10. Recuperação de diclofenaco em amostra de água no ponto C

Diclofenaco /mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
$5,00 \times 10^{-6}$	$3,19 \times 10^{-6} \pm 4,18 \times 10^{-7}$	63,8	-1,37
$3,50 \times 10^{-5}$	$3,61 \times 10^{-5} \pm 7,93 \times 10^{-7}$	103	
$1,00 \times 10^{-4}$	$7,34 \times 10^{-5} \pm 1,84 \times 10^{-6}$	73,4	

média \pm desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec \neq 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 4,303.

As recuperações obtidas na amostra do ponto D, variando de 56,4 a 88,3% indicaram que a recuperação média é estatisticamente diferente de 100% ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$), indicando interferência da matriz de amostra na determinação de diclofenaco.

Tabela 11. Recuperação de Diclofenaco em amostra de águas naturais no ponto D

Diclofenaco / mol L-1		Recuperação/ %	$t_{\text{calculado}}$
Adicionado	Encontrado		
$5,00 \times 10^{-6}$	$2,88 \times 10^{-6} \pm 6,84 \times 10^{-8}$	57,5	5,18
$3,50 \times 10^{-5}$	$3,09 \times 10^{-5} \pm 8,91 \times 10^{-7}$	88,3	
$1,00 \times 10^{-4}$	$5,64 \times 10^{-5} \pm 6,76 \times 10^{-7}$	56,4	

média \pm desvio padrão, n=3

(H_0): Rec=100%; (H_1): Rec \neq 100% (teste bilateral);

$t_{\text{tabelado}} = 4,303$.

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). Os valores do teste t aplicado encontrados, com 95% de confiança, apresentaram valores calculados menores que aqueles estabelecidos pelo valor tabelado (4,303). Isto indica que a média das recuperações nesta faixa de concentração estudada é estatisticamente igual a 100% ou seja, não apresenta interferência das matrizes de amostras.

4.2.7 Estudo da recuperação de diclofenaco nas amostras de água empregando o procedimento proposto com Rodamina-B

A recuperação de DCF nas amostras de águas com o procedimento que emprega a Rodamina-B como fluoróforo foi avaliada com a adição de concentrações diferentes de solução de referência de DCF ($5,00 \times 10^{-6}$, $1,50 \times 10^{-5}$, $3,50 \times 10^{-5}$ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L) as soluções de amostras. Os resultados de DCF obtidos, descontados daquele sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados estão apresentados nas Tabela 12 e Tabela 13.

A recuperação obtida foi avaliada aplicando-se um teste de hipótese, no qual a hipótese nula é que a diferença entre as recuperações não seja diferente de 100%. Verificou-se que o $t_{\text{calculado}}$ para os dois estudos de recuperação (-3,316 e -3,207) obtidos foram menores que o valor t_{tabelado} (4,541), indicando que a recuperação média é estatisticamente igual a 100%, no nível de confiança de 95%.

Tabela 12. Recuperação de Diclofenaco em amostra de águas no ponto A

Diclofenaco / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	$t_{\text{calculado}}$
Adicionado	Encontrado		
$5,00 \times 10^{-6}$	$3,56 \times 10^{-6} \pm 1,02 \times 10^{-8}$	71,2	-3,316
$1,50 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-5} \pm 8,99 \times 10^{-7}$	88,7	
$3,00 \times 10^{-5}$	$2,68 \times 10^{-5} \pm 4,10 \times 10^{-7}$	89,3	
$5,00 \times 10^{-5}$	$3,87 \times 10^{-5} \pm 5,39 \times 10^{-7}$	77,4	

média \pm desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec \neq 100% (teste bilateral);

$t_{\text{tabelado}} = 4,541$ (nível de confiança de 98%).

Tabela 13. Estudo de recuperação de Diclofenaco em amostra naturais no ponto B

Diclofenaco / mol L ⁻¹		Recuperação/	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado	%	
5,00 x 10 ⁻⁶	4,12 x 10 ⁻⁶ ± 1,02 x 10 ⁻⁸	82,3	-3,207
1,50 x 10 ⁻⁵	1,43 x 10 ⁻⁵ ± 8,99 x 10 ⁻⁷	95,3	
3,00 x 10 ⁻⁵	2,73 x 10 ⁻⁵ ± 4,10 x 10 ⁻⁷	91,0	
5,00 x 10 ⁻⁵	4,02 x 10 ⁻⁵ ± 5,39 x 10 ⁻⁷	80,0	

média ± desvio padrão, n=3;

H₀: Rec=100%; H₁: Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado} = 4,541 (nível de confiança de 98%).

Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, sendo estabelecida como hipótese nula (H₀): Rec. = 100% e como hipótese alternativa (H₁): Rec. ≠ 100% (teste bilateral). Os valores do teste t aplicado encontrados, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentaram valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado (4,541). Isto indica que a média das recuperações nesta faixa de concentração estudada é estatisticamente igual a 100% ou seja, não apresenta interferência das matrizes de amostras.

Na Tabela 14 estão descritos os alguns parâmetros de confiabilidade analítica de procedimentos descritos na literatura. Verificamos que as linearidades obtidas com o procedimento proposto foram superiores aqueles descritos, apresentando uma variação de concentração comparáveis aos procedimentos da tabela. Devemos destacar que no procedimento proposto não houve tratamento de amostra qualquer. Sendo assim, a aplicação de tratamento de amostra (extração em fase sólida, por exemplo) poderá melhorar

a exatidão do procedimento, bem como diminuir a faixa de concentração da curva analítica.

Tabela 14. Parâmetros de confiabilidade analítica de procedimentos descritos na literatura para determinação de diclofenaco em amostras de águas naturais

Método	Linearidade/ mol L ⁻¹	Recuperação/%	Ref.
UHPLC	3,38x10 ⁻⁸ a 8,45x10 ⁻⁷	97,6 a 102,4	[14]
HPLC com UV- detector fluorescência	3,38x10 ⁻¹¹ a 3,71x10 ⁻⁹	56 a 97	[18]
HPLC-DAD	1,01x10 ⁻⁸ a 4,05x10 ⁻⁶	102,0	[15]
GC-MS	3,38x10 ⁻¹¹ a 6,75x10 ⁻⁹	76	[24]
Espectrofluorímetro	5,00x10 ⁻⁶ a 1,00x10 ⁻⁴	63,8 a 103 56,4 a 88	(a)
Espectrofluorímetro (rodamina-B)	5,00x10 ⁻⁶ a 1,00x10 ⁻⁴	71,2 a 89 80,0 a 95,3	

UHPLC: ultra high performance liquid chromatography; DAD: diode array detector; GC: gas chromatography; MS: mass spectrometry; (a) procedimentos propostos.

4.3 Desenvolvimento de um procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de sulfametoxazol em amostras de águas

4.3.1 Matriz e emissão e excitação do Sulfametoxazol

A Figura 17 demonstra o comportamento de emissão do SMZ em meio de solução tampão no pH 6,0 o qual podemos observar na região de excitação

nos comprimentos de onda de 250 a 275 nm com uma banda de emissão com um máximo em 350 nm.

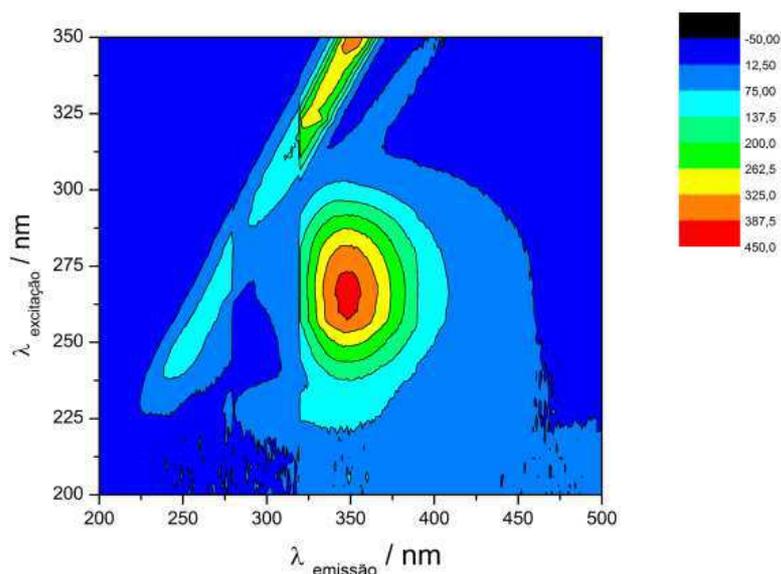


Figura 17. Matriz de excitação-emissão do sulfametoxazol.

4.3.2 Avaliação da influência do pH sobre a emissão de fluorescência do sulfametoxazol

A influência do pH do meio reacional sobre a intensidade de emissão foi estudada entre os valores de pH de 4,0 a 10,0 sendo os espectros obtidos apresentados na Figura 18. Verifica-se que o pH das soluções padrão de sulfametoxazol (SMZ) $2,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ não altera os perfis dos espectros de emissão.

O efeito do pH sobre a intensidade de emissão pode ser verificada na Figura 19. A intensidade de emissão apresenta os maiores sinais de resposta no intervalo pH 6,0 até 10,0. Para soluções com pH abaixo de 5,0 houve uma supressão do sinal analítico. Nas soluções com pH alcalino, a solução com pH

9,0 apresentou maior intensidade de emissão. Entretanto devido ao pequeno ganho de intensidade do sinal analítico entre os pHs 6 a10, selecionou-se o pH 6,0 para o desenvolvimento dos trabalhos, considerando que o pH ótimo determinado para o Diclofenaco foi o 6 e com o objetivo de diminuir efluentes e tornar o procedimento mais simples e rápido. optou-se por utilizar a mesma solução tampão para ambos os fármacos.

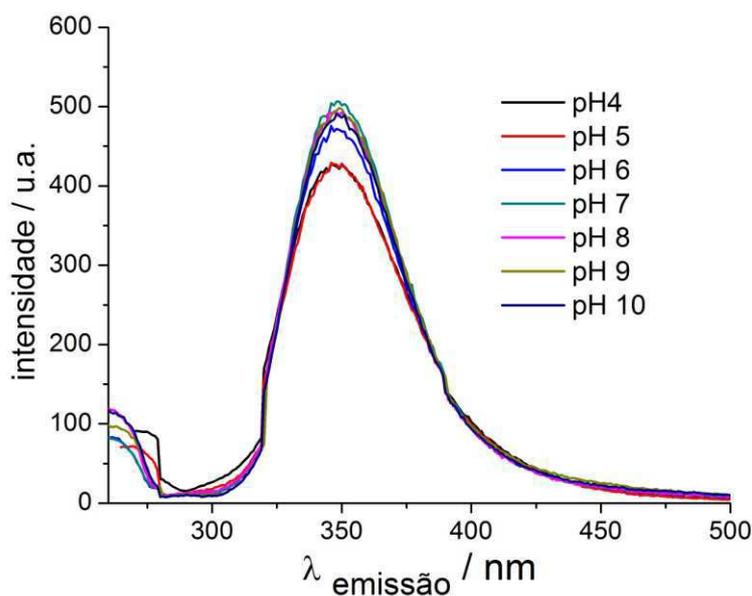


Figura 18. Influência do pH do meio nos espectros de emissão de solução padrão de SMZ $2,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ ($n=2$).

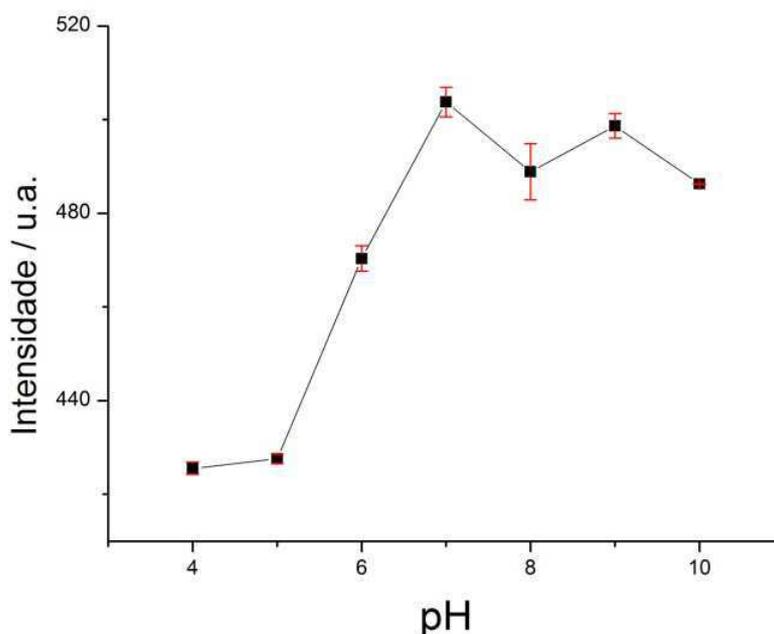


Figura 19. Influência do pH sobre a intensidade de emissão de uma solução padrão de SMZ $2,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$ ($n=2$).

4.3.3 Curva analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfametoxazol em amostras de águas

Depois de otimizado o pH para a obtenção dos espectros de emissão das soluções contendo Sulfametoxazol, foram obtidas as curvas analíticas do procedimento. As leituras foram realizadas a partir de diluições da solução padrão de SMZ nos λ_{ex} 260 nm e λ_{em} 350 nm. As concentrações avaliadas foram: $2,34 \times 10^{-7}$; $4,67 \times 10^{-7}$; $7,01 \times 10^{-7}$; $1,17 \times 10^{-6}$; $1,75 \times 10^{-6}$; $2,34 \times 10^{-6}$; $5,84 \times 10^{-6}$; $1,46 \times 10^{-5}$; $2,05 \times 10^{-5}$; $2,92 \times 10^{-5}$; $4,09 \times 10^{-5}$ e $5,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de SMZ. Os espectros de emissão das soluções padrão estão mostrados na Figura 20.

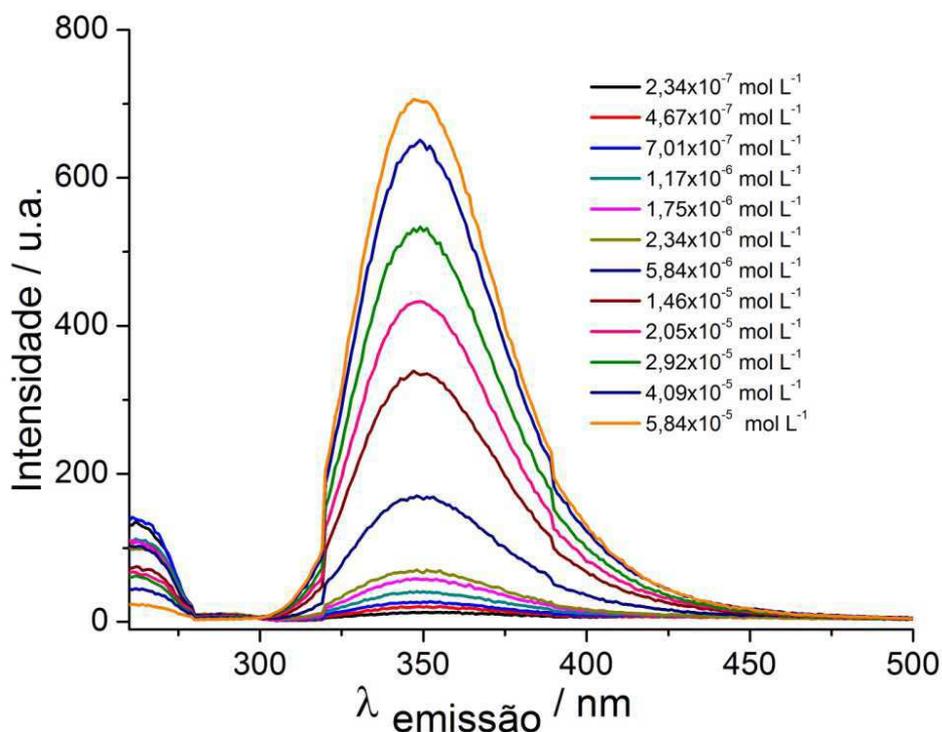


Figura 20. Espectros de emissão de soluções padrão de SMZ utilizados para a obtenção da curva analítica. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$.

A curva analítica foi construída utilizando-se a intensidade de emissão da solução contendo SMZ versus a concentração de SMZ. A curva analítica obtida apresentada na Figura 21, apresentou um comportamento não linear que resultou numa regressão com equação de segunda ordem $I = -249 \times 10^{-11} \times [\text{SMZ}]^2 + 2,55 \times 10^7 \times [\text{SMZ}] + 11,29$, $r=0,999$; onde I é a intensidade de emissão, $[\text{SMZ}]$ é a concentração de Sulfametoxazol em mol L^{-1} e r é o coeficiente de regressão.

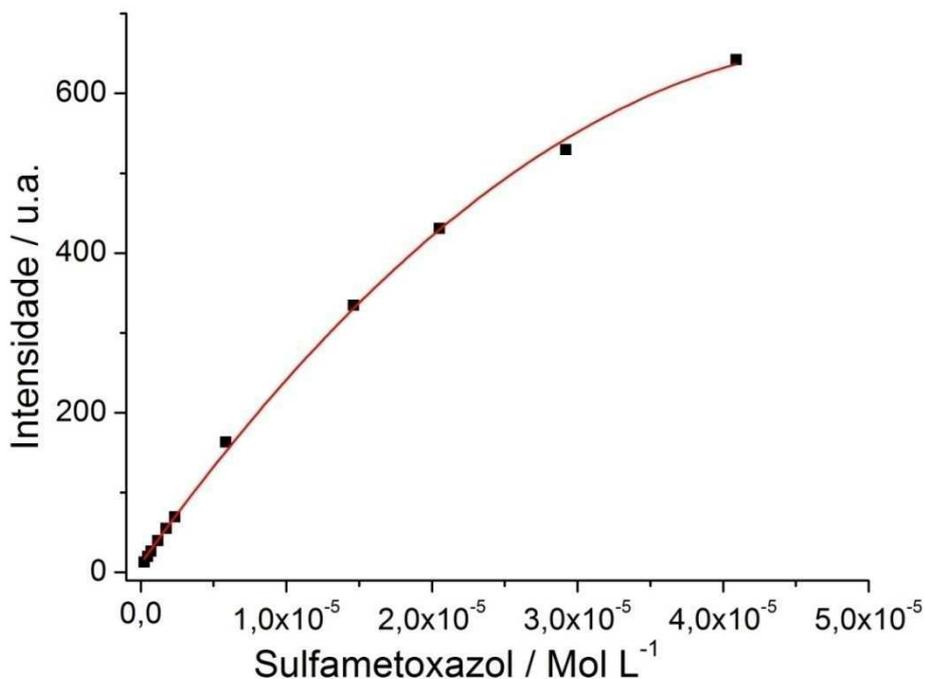


Figura 21. Curva analítica para a determinação espectrofluorimétrica de SMZ. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$ ($n=2$).

Na seqüência, uma curva analítica foi construída utilizando-se o log da intensidade versus o log da concentração de SMZ. A curva obtida desta maneira apresentou a forma linear entre as concentrações de $2,34 \times 10^{-7}$ a $4,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e está mostrada na Figura 22. A curva analítica pode ser descrita pela equação $\log I = 0,78 (\pm 0,01) \times \log [\text{SMZ}] + 6,306 (\pm 0,06)$, $r = 0,99$; onde I é a intensidade de emissão em 350 nm e $[\text{SMZ}]$ é a concentração de Sulfametoxazol em mol L^{-1} . A linearização da curva levou a obtenção de um modelo matemático linear.

A reprodutibilidade do procedimento foi avaliada pela construção de outra curva no qual pode ser descrita pela equação $\log I = 0,59 (\pm 0,02) \times \log [\text{SMZ}] + 5,46 (\pm 0,15)$; $r = 0,99$.

A análise de variância realizada com os dados da curva analítica, para avaliar a significância da regressão. Como apresentado na Tabela 15, o alto

valor de F (3.988,88) indica a existência de uma relação linear entre o log da Intensidade e o log concentração, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o recomendado.

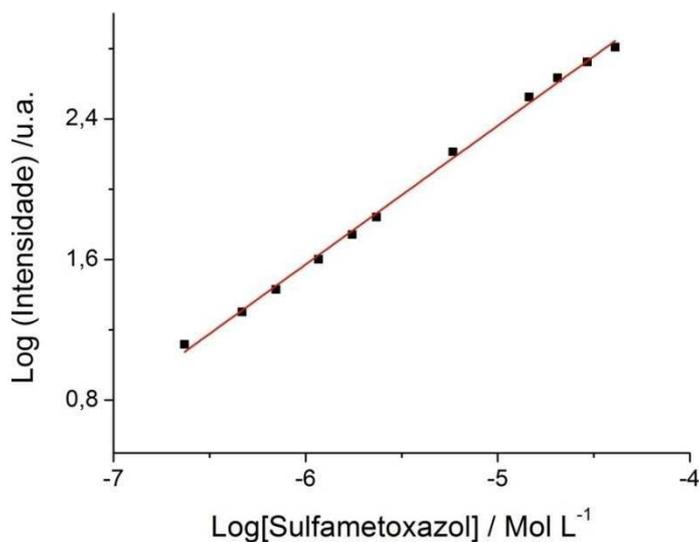


Figura 22. Curva analítica para a determinação de SMZ em amostras de águas. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$ e pH 6,0 (n=2).

Tabela 15. Análise de variância da curva analítica para determinação de sulfametoxazol

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	3,73119	3,73	3.988,88	$3,15 \times 10^{-13}$
Resíduo	9	0,00842	$9,35 \times 10^{-4}$		
Total	10	3,73961			

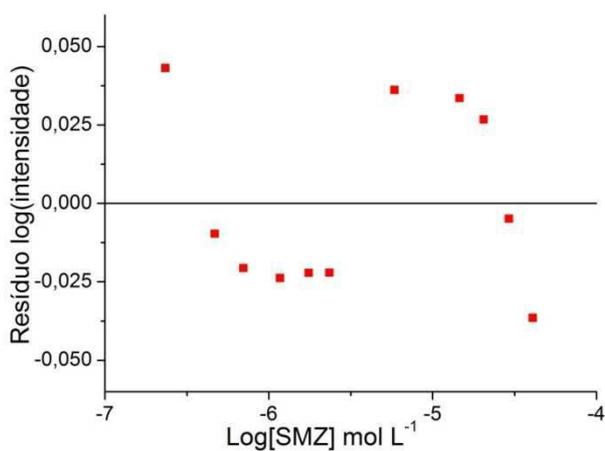


Figura 23. Gráfico de resíduos da curva analítica para a determinação de SMZ em amostras de águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto.

Na Tabela 16 estão apresentados alguns parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento proposto para a determinação de sulfametoxazol.

Tabela 16. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfametoxazol com Rodamina-B

Limite de Detecção ($3\sigma_{\text{branco}}/IC$)	$2,71 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} (\mu\text{g L}^{-1})$
Limite de Quantificação ($10 \sigma_{\text{branco}}/IC$)	$3,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
Faixa Linear	$2,34 \times 10^{-7} \text{ a } 4,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

4.3.4 Recuperação do Sulfametoxazol em Amostras de Águas utilizado o Procedimento Espectrofluorimétrico Proposto

A exatidão do procedimento proposto para a determinação de Sulfametoxazol foi avaliada pelo estudo de adição e recuperação do analito nas amostras de águas de rio. Neste estudo, alíquotas de solução contendo Sulfametoxazol variando entre $4,74 \times 10^{-7}$ a $2,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas nas amostras de águas e a concentração final foi determinada empregando o procedimento proposto. A concentração determinada descontada daquela da solução inicial, sem a adição da solução padrão foi comparada com a concentração da solução padrão adicionada. Nas tabelas de 17 a 20 estão apresentados os valores de recuperação de sulfametoxazol em amostras de águas dos pontos A, B, C e D, respectivamente.

Tabela 17. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra A)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (95%)
Adicionado	Encontrado		
4,74x10 ⁻⁷	3,39x10 ⁻⁷ ± 2,05 x10 ⁻⁷	71,6	1,303
4,74 x10 ⁻⁶	5,26x10 ⁻⁶ ± 1,71 x10 ⁻⁷	110,9	
1,18x10 ⁻⁵	1,46x10 ⁻⁵ ± 4,38 x10 ⁻⁷	123,7	
2,37x10 ⁻⁵	2,65x10 ⁻⁵ ± 3,54 x10 ⁻⁷	112,1	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 2,77 (nível de confiança de 95%).

Tabela 18. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra B)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (98%)
Adicionado	Encontrado		
4,74x10 ⁻⁷	3,8 x10 ⁻⁷ ± 3,5x10 ⁻⁸	81,2	2,890
4,74x10 ⁻⁶	5,44x10 ⁻⁶ ± 2,57x10 ⁻⁷	114,8	
1,18x10 ⁻⁵	1,50x10 ⁻⁵ ± 1,65x10 ⁻⁷	127,3	
2,37x10 ⁻⁵	2,75x10 ⁻⁵ ± 3,27x10 ⁻⁷	116,2	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 3,74 (nível de confiança de 98%).

Tabela 19. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra C)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (95%)
Adicionado	Encontrado		
4,74 x 10 ⁻⁷	3,71 x10 ⁻⁷ ± 2,74 x10 ⁻⁸	78,3	0,599
4,74 x 10 ⁻⁶	4,83 x10 ⁻⁶ ± 9,95 x10 ⁻⁸	101,9	
1,18 x 10 ⁻⁵	1,42 x10 ⁻⁵ ± 5,57 x10 ⁻⁸	120,4	
2,37 x 10 ⁻⁵	2,61 x10 ⁻⁵ ± 2,11 x10 ⁻⁸	110,5	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 2,77 (nível de confiança de 95%).

Tabela 20. Recuperação de Sulfametoxazol em amostra de água empregando o procedimento proposto (Amostra D)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (95%)
Adicionado	Encontrado		
4,74 x 10 ⁻⁷	3,71 x10 ⁻⁷ ± 2,74 x10 ⁻⁹	78,3	0,924
4,74 x 10 ⁻⁶	5,16 x10 ⁻⁶ ± 1,20 x10 ⁻⁷	101,9	
1,18 x 10 ⁻⁵	1,41 x10 ⁻⁵ ± 9,26 x10 ⁻⁸	120,4	
2,37 x 10 ⁻⁵	2,51 x10 ⁻⁵ ± 3,08 x10 ⁻⁷	110,5	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 2,77 (nível de confiança de 95%).

Usou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do método, sendo estabelecida como hipótese nula (H₀): Rec = 100% e como hipótese alternativa (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral). Os valores do teste t aplicado encontrados, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentaram valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado de 2,77 para o nível de confiança de 95% e de 3,74 para um nível de confiança de 98%. Isto indica que a média das recuperações nesta faixa de concentração estudada é estatisticamente igual a 100% ou seja, não apresenta interferência das matrizes de amostras.

4.3.5 Avaliação do Emprego da Rodamina-B como Padrão Interno no Procedimento Espectrofluorimétrico para a Determinação de Sulfametoxazol em Amostras de Águas

Devido os valores das recuperações observados, avaliou-se o emprego de solução padrão de Rodamina-B como padrão interno visando contornar as interferências de absorção de radiação possivelmente causadas pelas

substâncias presentes nas matrizes de amostras. Para isso, construiu-se uma curva analítica, na qual foi obtida com soluções padrão de Sulfametoxazol em diferentes concentrações contendo Rodamina-B na concentração de 2×10^{-7} mol L⁻¹. Os espectros de emissão das soluções padrão de Sulfametoxazol e Rodamina-B estão apresentados na Figura 24. Nesta figura, verificamos no espectro o aumento da intensidade de emissão causada pelo aumento na concentração do SMZ em 350 nm, com a respectiva supressão da intensidade de emissão da Rodamina-B em 570 nm.

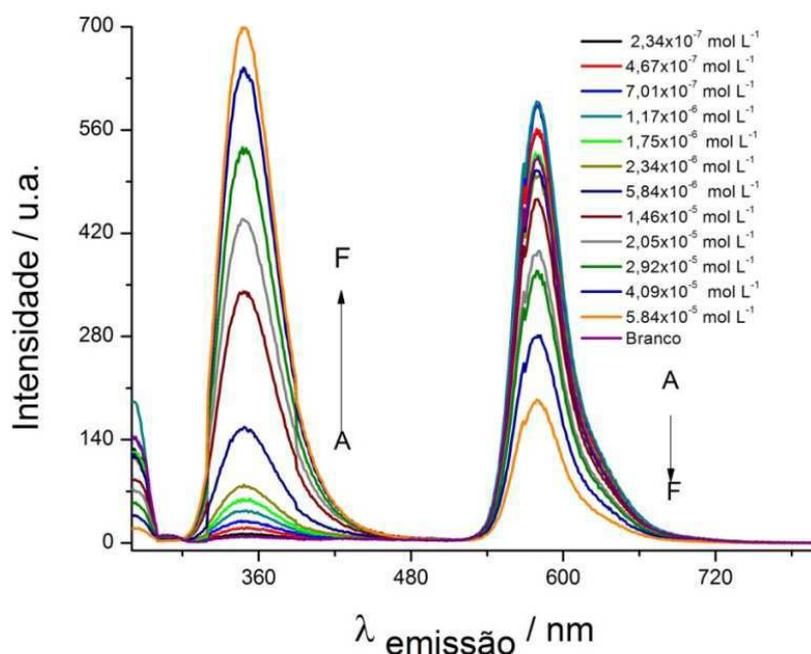


Figura 24. Espectro de emissão da curva analítica SMZ empregando solução de Rodamina-B 2×10^{-7} mol L⁻¹ como padrão interno. $\lambda_{\text{excitação}} = 260$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm ($n=2$).

A curva analítica obtida, apresentada na Figura 25, foi construída utilizando a razão entre a intensidade de emissão do SMZ e Rodamina-B no mesmo espectro, o coeficiente obtido dos sinais analitos foram correlacionados com a concentração de SMZ que ocasiona a emissão. O emprego da Rodamina-B não modifica a resposta da curva analítica, verificando-se a

relação linear entre a resposta e a concentração. A curva analítica pode ser descrita pela equação $I = 8,93 \times 10^4 (\pm 0,08 \times 10^4) \times [\text{SMZ}] + 0,96 \times 10^{-2} (\pm 1 \times 10^{-2})$ $r=0,999$; onde I é a intensidade de emissão, $[\text{SMZ}]$ é a concentração de Sulfametoxazol em mol L^{-1} e r é o coeficiente de regressão.

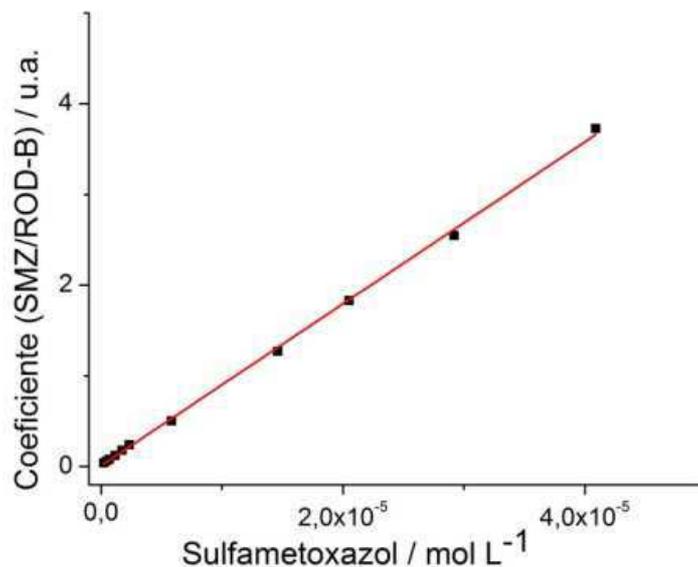


Figura 25. Curva analítica para a determinação de SMZ utilizando solução de Rodamina-B $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ como padrão interno. $\lambda_{\text{excitação}} = 260 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$ ($n=3$).

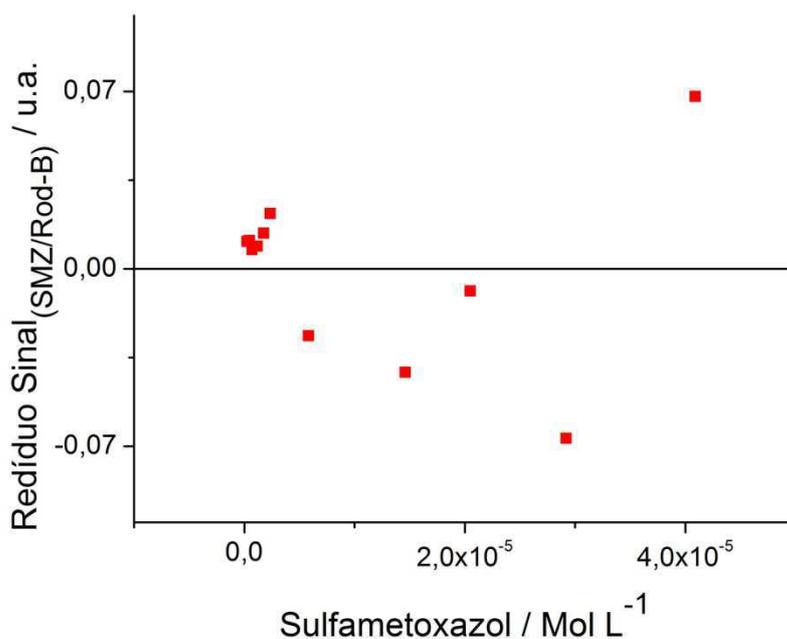


Figura 26. Gráficos dos resíduos calculados da curva analítica para a determinação de Sulfametoxazol.

Tabela 21. Análise de variância da curva analítica obtida para a determinação de Sulfametoxazol empregado Rodamina como padrão interno

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	15,48868	15,48868	11.074,18	$3,2 \times 10^{-15}$
Resíduo	9	0,01259	0,0014		
Total	10	15,50127			

Tabela 22. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Sulfametoxazol utilizando Rodamina-B como padrão interno

Limite de Detecção ($3 \times \sigma_{\text{branco}}/IC$)	$3,53 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (8,94 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Limite de Quantificação ($10 \times \sigma_{\text{branco}}/IC$)	$1,18 \times 10^{-7} / \text{mol L}^{-1}$
Faixa Linear	$2,34 \times 10^{-7}$ a $4,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

σ =desvio padrão.

4.3.6 Avaliação da Recuperação de Sulfametoxazol em Amostras de Águas Empregando o Procedimento Espectrofluorimétrico Proposto Utilizando a Rodamina-B Como Padrão Interno

A exatidão do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de sulfametoxazol em amostras de águas foi avaliado pelo estudo de recuperação. Diferentes alíquotas de solução padrão de sulfametoxazol foram adicionados a soluções de amostras e a concentração do fármaco foi determinada. O valor encontrado descontado daquela concentração

inicial da amostra foi comparado com a concentração de solução padrão adicionada a amostra. O valor da recuperação indica a interferência da matriz de amostra na determinação do sulfametoxazol utilizando o procedimento proposto. Os valores de recuperação estão indicados nas Tabela 23 e Tabela 24.

Tabela 23. Recuperação de diclofenaco na amostra de água (Amostra C)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (95%)
Adicionado	Encontrado		
7,01x10 ⁻⁷	6,53 x10 ⁻⁷ ± 6,91 x10 ⁻⁸	93,1	2,382
5,84x10 ⁻⁶	6,26 x10 ⁻⁶ ± 4,68 x10 ⁻⁷	107	
1,46 x10 ⁻⁵	1,80 x10 ⁻⁵ ± 1,56 x10 ⁻⁶	123	
2,92 x10 ⁻⁵	3,40 x10 ⁻⁵ ± 3,82 x10 ⁻⁷	116	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 3,18 (nível de confiança de 95%).

Tabela 24. Recuperação de diclofenaco em amostra de água (amostra D)

Sulfametoxazol / mol L ⁻¹		Recuperação/ %	t _{calculado} (95%)
Adicionado	Encontrado		
7,01x10 ⁻⁷	6,43 x10 ⁻⁷ ± 7x10 ⁻⁸	91,7	2,586
5,84x10 ⁻⁶	6,94x10 ⁻⁶ ± 9 x10 ⁻⁷	119	
1,46x10 ⁻⁵	1,68x10 ⁻⁵ ± 1x10 ⁻⁶	115	
2,92x10 ⁻⁵	3,33x10 ⁻⁵ ± 4x10 ⁻⁷	114	

média ± desvio padrão, n=3

(H₀): Rec=100%; (H₁): Rec ≠ 100% (teste bilateral);

t_{tabelado}= 3,18 (nível de confiança de 95%).

As recuperações das amostras ambientais variaram entre 93,1 a 123%. A recuperação foi avaliada aplicando-se o teste de hipótese para as recuperações médias obtidas. Tomando-se a hipótese nula (H_0), na qual a recuperação média é igual a 100%, ou seja, sem interferência das matrizes de amostras e a hipótese alternativa, a interferência das matrizes de amostras, verificamos ao nível de confiança de 95% a falta de interferência das matrizes de amostras.

Na Tabela 14 estão descritos os alguns parâmetros de confiabilidade analítica de procedimentos descritos na literatura. Verificamos que as linearidades obtidas com o procedimento proposto foram superiores aqueles descritos. Com relação a recuperação do sulfametoxazol, os valores de recuperação foram comparáveis com aqueles procedimentos descritos na tabela sendo a maioria utiliza métodos de separação. Devemos destacar ainda que, no procedimento proposto não houve tratamento de amostra qualquer. Sendo assim, a aplicação de tratamento de amostra (extração em fase sólida, por exemplo) poderá melhorar a exatidão do procedimento, bem como diminuir a faixa de concentração da curva analítica.

5 CONCLUSÕES

Os procedimentos propostos para determinação de diclofenaco e Sulfametoxazol em amostras de águas, empregando a técnica de espectroscopia de emissão molecular demonstraram-se simples, robustos e com faixa linear da curva analítica adequada para a determinação destes analitos nas amostras analisadas. Os valores de recuperação dos analitos nas amostras analisadas foram similares quando comparados com trabalhos descritos na literatura.

O emprego da Rodamina-B como padrão interno melhorou a linearidade de curva analítica, mas não tornou o procedimento mais sensível. O procedimento apresentou resultados satisfatórios, que podem ser melhorados com o emprego de um procedimento de preparo de amostra.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giger, W., et al., *Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters*. *Chimia*, 2003. **57**: p. 485–491.
2. Oaks, J.L., et al., *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*. *NATURE*, 2004. **427**: p. 630-633.
3. Pinto, E.A., *IMPACTE AMBIENTAL DOS MEDICAMENTOS*, in *Ciências Farmacêuticas*. 2011, Universidade Fernando Pessoa: Porto. p. 79.
4. Zhang, Y., S.-U. Gei, Y. Yen, and C. Gal, *Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*. *Chemosphere*, 2008. **73**(8): p. 1151-1161.
5. Bruno, A. *descarte tem lugar certo. atuação farmacêutica no brasil 2012* [cited 2013 11 de Dezembro]; 230:[Available from: <http://www.guiadafarmacia.com.br/edicao-230-atuacao-farmacologica-no-brasil/descarte-tem-lugar-certo>].
6. Golan, D.E., et al., *Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia* ed. G. KOOGAN. 2009, Rio de Janeiro.
7. Skoog, D.A., F.J. Holler, and D.M. West, *Fundamentals of analytical chemistry / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler*. Saunders golden sunburst series. 1988, New York: Saunders College Pub.
8. Harris, D.C., *Análise de Química Quantitativa*, ed. LTC. Vol. 7ª edição 2011, Rio de Janeiro [45 - 81]. [100 - 101].
9. Skoog, D.A., et al., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8ª edição ed, ed. T. Learning. 1997, Belmont-USA. 91-119.
10. Kellner, R.A., et al., *Analytical Chemistry*, ed. Wiley-VCH. Vol. second edition. 2004, Germany. 121-134.
11. Baldez, E.E., N.F.R. ;, and R.J. Cassella, *Remoção de Rodamina B de Efluentes Industriais Empregando Espumas de Poliuretano*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2007.
12. Frederice, R., *Fluorescência molecular em nano partícula de sílica marcada com quercetina e rodamina b*, in *Mestre em Ciência 2009*, USP: São Carlos.
13. Ahmedchekkat, F., et al., *Sonophotocatalytic degradation of Rhodamine B using a novel reactor geometry: Effect of operating conditions*. *Chemical Engineering Journal*, 2011. **178**(0): p. 244-251.
14. Castillo, A.n., et al., *Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **765**(0): p. 77-85.
15. Rigobello, E.S., et al., *Removal of diclofenac by conventional drinking water treatment processes and granular activated carbon filtration*. *Chemosphere*, 2013. **92**(2): p. 184-191.
16. Matin, A.A., M.A. Farajzadeh, and A. Jouyban, *A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations*. *Il Farmaco*, 2005. **60**(10): p. 855-858.
17. Goyal, R.N., S. Chatterjee, and B. Agrawal, *Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode*

- and its determination in human urine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **145**(2): p. 743-748.
18. Patrolecco, L., et al., *Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection*. *Microchemical Journal*, 2012. **107**(0): p. 165-171.
 19. Fernández de Córdova, M.L., P. Ortega Barrales, and A. Molina Díaz, *Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry*. *Analytica Chimica Acta*, 1998. **369**(3): p. 263-268.
 20. Pérez-Ruiz, T., et al., *Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997. **16**(2): p. 249-254.
 21. Arancibia, J.A., M.A. Boldrini, and G.M. Escandar, *Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of β -cyclodextrin*. *Talanta*, 2000. **52**(2): p. 261-268.
 22. Jadhav, S.D., et al., *Validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination and in vitro dissolution studies of thiocolchicoside and diclofenac potassium from tablet dosage form*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2011(0).
 23. Mokhtari, A., et al., *Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **169**(0): p. 96-105.
 24. Koutsouba, V., Heberer, et al., *Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry*. *Chemosphere*, 2003. **51**: p. 69-75.
 25. García-Galán, M.J., M.S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, *Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS)*. *Talanta*, 2010. **81**(1-2): p. 355-366.
 26. Sun, L., et al., *Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC-UV detection*. *Chemosphere*, 2009. **77**(10): p. 1306-1312.
 27. Herrera-Herrera, A.V., et al., *Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples*. *Talanta*, 2013. **116**(0): p. 695-703.
 28. Castiglioni, S., et al., *A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1092**(2): p. 206-215.
 29. Lin, C.-Y. and S.-D. Huang, *Application of liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid-chromatography for the determination of sulfonamides in water*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **612**(1): p. 37-43.

30. Kummer, C.L. and T.C.R.B. Coelho, *Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores de Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais Rev Bras Anestesiol*, 2002. **52**(4): p. 498-512
31. Herrera-Herrera, A.V., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013. **75**(0): p. 130-137.
32. Lara, F.J., et al., *Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(15): p. 3372-3379.
33. Xie, X., et al., *Extraction mechanism of sulfamethoxazole in water samples using aqueous two-phase systems of poly(propylene glycol) and salt*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **687**(1): p. 61-66.
34. López-Martínez, L., et al., *Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxypyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002. **30**(1): p. 77-85.
35. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. Springer. Vol. 4ª edição. 2010, New York.
36. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova*, 2004. **27**: p. 771-780.
37. INMETRO, *ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS -DOQ-CGCRE-008*. 2007.
38. Pimentel, M.F. and B.d.B. Neto, *Calibração: uma revisão para químicos analíticos*. *Química Nova*, 1996. **19**: p. 268-277.
39. Skoog, D.A., et al., *Fundamento de Química Analítica*, ed. C. Learning. 2010, São Paulo. 163-199.
40. ANVISA, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003*. 2003.
41. APVMA, *Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products*. 2004.
42. Fonseca, J.S.d. and G.d.A. Martins, *Curso de Estatística*. 6ª edição ed, ed. Atlas. 2012, São Paulo. 252-273.
43. Larson, R. and B. Farber, *Estatística Aplicada*. 2ª edição ed, ed. P.P. Hall. 2004, São Paulo.
44. Levine, D.M., et al., *Estatística - teoria e aplicações usando o microsoft excel em português*. 3ª edição ed, ed. LTC. 2005, Rio de Janeiro. 390 - 398.
45. Hao, R., et al., *Use of three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy for predicting the disinfection by-product formation potential of reclaimed water*. *Water Research*, 2012. **46**(17): p. 5765-5776.
46. Zhang, H.-M., et al., *Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between triphenyltin and humic acids*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011. **78**(3): p. 1018-1022.