

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

**PROCEDIMENTOS
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL,
SULFANILAMIDA, ENROFLOXOCINO E
NORFLOXACINO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**

MANOEL GARCIA DE OLIVEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

Agosto/2016

**PROCEDIMENTOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS
PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL,
SULFANILAMIDA, ENROFLOXOCINO E
NORFLOXACINO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

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

DOURADOS/MS

Agosto/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O48p	<p>Oliveira, Manoel Garcia de. Procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxocino e norfloxacino em amostras de águas. / Manoel Garcia de Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 91f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. antibiótico. 2. validação. 3. antifúngico. 4. Espectroscopia. I. Título.</p>
------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

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



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxocino e norfloxacino em amostras de águas**”, de autoria de **Manoel Garcia de Oliveira**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. João Batista Gomes de Souza
Membro Examinador (UFMS)

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

Dourados/MS, 26 de agosto de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Arnaldo Alves de Oliveira e Lucilene Bertolino Garcia de Oliveira assim como minha irmã Fernanda Garcia de Oliveira a eles devem ser dados os louros desse trabalho pois sem o suporte psicológico, amoroso, contagiante e principalmente na grande fé que a família tem meus esforços não seriam em vão, assim como não foram. Sou imensamente grato a vocês, alicerces do meu viver e sonhar.

Agradecimentos

A Deus primeiramente pois sem o suporte para comigo seria impossível concluir o trabalho.

No decorrer deste trabalho houve pessoas essenciais, às quais eu não poderia deixar de lembrar. A todas essas grandes pessoas, muito obrigado.

A meus pais Arnaldo Alves de Oliveira e Lucilene Bertolino Garcia de Oliveira por todo amor a mim dispensado, desde minha criação básica até hoje, sendo suporte imprescindível para conclusão do trabalho.

A minha irmã Fernanda Garcia de Oliveira pela ajuda em diversos momentos em que o desejo era de fraquejar, sempre me lembrando que o futuro deve ser melhor.

A meu orientador Heberth Juliano Vieira por sua super compreensão comigo em relação aos conteúdos não só do trabalho, mas como todo o conhecimento que teve a inexplicável paciência de me ensinar $9,0 \times 10^9$ vezes até que eu tivesse realmente compreendido.

A Professora Doutora Daniele MIGNOLO, que teve grande participação na realização do trabalho sempre me animando e não deixando que caísse no comodismo, além claro dos inúmeros auxílios na correção da qualificação e dissertação, nas correções das referências e até na confecção dos slides, sendo sempre a mais paciente e atenciosa possível.

A Nayara Fernanda Lisboa Garcia que além de namorada/amiga, fez o papel de conselheira e professora, por todo auxílio acadêmico e psicológico os quais não foram poucos pois momentos de “mimimi” e sentimentos de que tudo dava errado eram constantes, além claro de todo amor o qual ela demonstrou por mim, meu muito obrigado minha linda.

A dona Neli de Souza Lisboa que me acolheu de braços abertos em sua casa quando precisava, sempre me recebendo da melhor maneira possível e claro com uma comida maravilhosa hehe.

A meus amigos do Laboratório de Cromatografia e Espectroscopia Aplicada – LECA pelos auxílios nos experimentos.

A minha amiga Juraciema Bastos, a qual considero amizade verdadeira além de ser uma espécie de professora particular de química que me ajudou em diversas vezes na realização dos meus experimentos e no tratamento dos dados e quando ficava torrando a mesma com assuntos nada a ver com o conteúdo de laboratórios, ela sempre tinha uma resposta.

A meus amigos Rodrigo (hidrogênio), Flávio (russo), Fabiano (bactéria), Danilo (yudi), Wilson, Herberth Lee, (não é o Bruce mas é o Lee, como o professor sempre o apresentou), Danilo (bauru), Higor, Thiago (feio), Tiago (Tiago do Boxe), Maycon, Anderson, Rafael (Backs) e Nighel a todos pelos inúmeros “cafés e tererés” filosóficos os quais serviam claro que para troca de conhecimentos sobre novos conteúdos mas também para espairer as ideias quando tudo parecia perdido dentro do laboratório.

A meu amigo Rodrigo Avalo de Naviraí que me apoiou sem medidas e esteve sempre presente nos momentos de dificuldade e alegria deste mestrado.

Aos guris da república, Neymar e Thiago, por toda parceria durante meu primeiro ano de mestrado e por todo conhecimento transmitido a mim, sempre dispostos a ajudar no que era preciso.

Professor Rogerio Cesar de Lara, meu professor de Analítica da graduação o qual trago como exemplo para meu futuro como professor.

Professor Jorge Raposo, que sempre perguntava como estava meu trabalho e sempre me incentivou para a conclusão do mesmo.

A CAPES e a Fundect por todo aporte financeiro para realização do trabalho.

A Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD pela oportunidade da realização do mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Epigrafe

Eu serei caipira mesmo quando for doutor...

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito.....	28
Tabela 2. Limites de intervalo utilizados na validação de metodologia analítica	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 3. Análise de variância da curva analítica para determinação de cetoconazol ..	42
Tabela 4. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Cetoconazol	42
Tabela 5. Equações das curvas analíticas e LD e LQ do procedimento proposto para a determinação de cetoconazol	43
Tabela 6. Recuperação de cetoconazol em água potável empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico pH de 0,9	43
Tabela 7. Recuperação de cetoconazol em água de superfície empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico pH de 0,9	44
Tabela 8. Comparação do método proposto para cetoconazol em relação a literatura...	45
Tabela 9. Análise de variância da curva analítica para a determinação de cetoconazol empregando procedimento oxidativo.....	54
Tabela 10. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Cetoconazol empregando procedimento oxidativo	55
Tabela 11. Equações das curvas analíticas para determinação de cetoconazol empregando procedimento oxidativo	55
Tabela 12. Ensaios de recuperação para a determinação de Cetoconazol em água potável empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹	56
Tabela 13. Recuperação de cetoconazol em água de superfície empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico pH de 0,9	56
Tabela 14. Recuperação de cetoconazol em água de piscicultura empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico pH de 0,9	56
Tabela 15. Comparação dos parâmetros de confiabilidade analítica entre os procedimentos para determinação de cetoconazol (procedimento direto e oxidativo)...	57
Tabela 16. Análise de variância da curva analítica para determinação de sulfanilamida empregando o procedimento espectrofluorimétrico	64
Tabela 17. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfanilamida	64
Tabela 18. Equações das curvas analíticas para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto.	65
Tabela 19. Ensaios de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água potável, ácido clorídrico pH 1,0	66
Tabela 20. Ensaios de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água LECA, ácido clorídrico pH 1,0	66
Tabela 21. Ensaios de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água FACET, ácido clorídrico pH 1,0.....	66
Tabela 22. Análise de variância da curva analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto	72

Tabela 23. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação do enrofloxacino.....	72
Tabela 24. Equações das curvas analíticas para determinação do enrofloxacino empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto	73
Tabela 25. Ensaios de recuperação para a determinação do enrofloxacino em água de superfície, em ácido clorídrico pH 3,0.....	74
Tabela 26. Ensaios de recuperação para a determinação do enrofloxacino em água de potável, em ácido clorídrico pH 3,0.....	74
Tabela 27. Ensaios de recuperação para a determinação do enrofloxacino em leite, em ácido clorídrico pH 3,0	74
Tabela 28. Análise de variância da curva analítica para determinação do norfloxacino empregando o procedimento proposto.....	80
Tabela 29. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação do norfloxacino.....	81
Tabela 30. Equações das curvas analíticas para determinação do norfloxacino empregando o procedimento proposto.....	82
Tabela 31. Ensaios de recuperação para a determinação do norfloxacino em água de superfície em ácido clorídrico pH 3,0.....	82
Tabela 32. Estudo de recuperação para a determinação do norfloxacino em água de potável em ácido clorídrico pH 3,0.....	83
Tabela 33. Estudo de recuperação para a determinação do norfloxacino em amostra de leite UHT em ácido clorídrico pH 3,0	83
Tabela 34. Comparação para os procedimentos propostos entre os antibióticos enrofloxacino e norfloxacino	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Matriz de excitação-emissão de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico 0,10 mol L ⁻¹	35
Figura 2. Espectro de excitação (a) e emissão (b) de Cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico 0,10 mol L ⁻¹	36
Figura 3. Influência do pH sobre intensidade de emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n=3). $\lambda_{\text{excitação}}=265$ nm.	37
Figura 4. Efeito do pH e ácidos (H ₂ SO ₄ e HCl) sobre intensidade de emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ .(n=3)	38
Figura 5. Estrutura química do Cetoconazol. As letras (A-D) indicam os diferentes grupos funcionais.....	39
Figura 6. Distribuição das espécies de cetoconazol em solução aquosa em função do pH.....	40
Figura 7. Curva analítica para determinação de cetoconazol empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico pH de 0,9(n = 3). $\lambda_{\text{excitação}} = 265$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 380$ nm.	40
Figura 8. Gráfico dos resíduos em função da concentração de cetoconazol obtidos da curva analítica para determinação de cetoconazol pelo procedimento direto em ácido sulfúrico pH de 0,9.....	41
Figura 9. Matriz de excitação e emissão de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em Cério(IV) $7,2 \times 10^{-4}$ em ácido sulfúrico pH 0,9	47
Figura 10. Espectro de (a) excitação e (b) emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ em Cério(IV) $7,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico pH 0,9.	48
Figura 11. Matriz de excitação e emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-3}$ em ácido sulfúrico pH 0,9	49
Figura 12. Espectro de excitação (a) e emissão de solução padrão de Cério(IV) (b) $1,80 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico pH 0,9	50
Figura 13. Influência do pH sobre intensidade de emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-4}$ (n=3).....	51
Figura 14. Efeito da concentração do ácido sulfúrico sobre intensidade de emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n=3).	52
Figura 15. Curva analítica para determinação de cetoconazol empregando o procedimento oxidativo em ácido sulfúrico pH de 0,9 (n = 3).	53
Figura 16. Gráfico dos resíduos em função da concentração de cetoconazol pelo procedimento oxidativo em ácido sulfúrico pH de 0,9	54
Figura 17. Matriz de excitação e emissão de sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido clorídrico pH 1,0	58
Figura 18. Espectro de excitação (a) e emissão (b) de solução padrão de sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em ácido clorídrico pH 1,0.	59
Figura 19. Espectros de emissão de solução padrão de sulfanilamida $1,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ obtidos em diferentes concentrações (n=3). $\lambda_{\text{excitação}} = 245$ nm.	60
Figura 20. Gráfico de distribuição das espécies de Sulfanilamida (pKa 10,6).	61
Figura 21. Efeito do pH sobre intensidade de emissão de solução padrão de sulfanilamida $1,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n=3).	61

Figura 22. Curva analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento proposto em ácido clorídrico pH 1,0. (n = 3).....	62
Figura 23 Gráfico dos resíduos em função da concentração de sulfanilamida em ácido clorídrico pH 1,0.	63
Figura 24 .Matriz de excitação e emissão de solução padrão de enrofloxacino $3,10 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução de ácido acético 1% v/v.	68
Figura 25. Efeito da concentração de H ₂ SO ₄ , HCl e NaOH na intensidade de emissão do Enrofloxacino.....	69
Figura 26 Curva analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto em ácido clorídrico pH de 3,0 (n = 3). $\lambda_{\text{excitação}}=370$ nm, $\lambda_{\text{emissão}}=448$ nm.	70
Figura 27 Gráfico dos resíduos em função da concentração de enrofloxacino da curva analítica em ácido clorídrico pH de 3,0.	71
Figura 28. Matriz de excitação e emissão do norfloxacino $3,10 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	77
Figura 29. Efeito da concentração de H ₂ SO ₄ , HCl e NaOH na intensidade de emissão do Norfloxacino.	78
Figura 30. Curva analítica para determinação do norfloxacino empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto em ácido clorídrico pH de 3,0. (n = 3), $\lambda_{\text{excitação}}= 370$, $\lambda_{\text{emissão}}= 446$ nm.....	79
Figura 31 Gráfico de resíduos em função da concentração do norfloxacino em ácido clorídrico pH de 3,0.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

CTZ - Cetoconazol

SAM - Sulfanilamida

ENRO - Enrofloxacino

NOR - Norfloxacino

SAs - Sulfonamidas

MEE - Matriz de Excitação e Emissão

DNA - Ácido Nucleico Desoxidoribonucleico

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

ETA - Estação de Tratamento de Água

DE - Desreguladores Endócrinos

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UV-Vis - Espectroscopia Molecular

pH - Potencial Hidrogeniônico

FDA - Agência de Alimentos e Drogas

λ - Comprimento de Onda

HCl - Ácido Clorídrico

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

CH₃COOH - Ácido Acético

NaOH - Hidróxido de Sódio

RESUMO

PROCEDIMENTOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL, SULFANILAMIDA, ENROFLOXOCINO E NORFLOXACINO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS. Atualmente, devido à grande intensidade das atividades antropogênicas torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de procedimentos analíticos para quantificação de substâncias com atividade biológicas, principalmente em relação aos recursos hídricos. A alta medicação e a necessidade do aumento de produtividade animal para suprir a demanda do mercado, ocasiona o descarte de enorme quantidade de substâncias com atividade biológicas como efluentes ou excretados pelos organismos no meio ambiente. Esse descarte causa riscos de contaminações dos lençóis freáticos e águas de superfície, afetando diretamente o ecossistema e a saúde humana. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar procedimentos analíticos para a quantificação da presença dos fármacos: cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxacino e norfloxacino, em águas utilizando a espectroscopia de fluorescência. Neste trabalho, buscou-se empregar solventes com baixo potencial de contaminação ao meio ambiente e analista, visando os princípios da química verde. O procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de direta de cetoconazol, monitorou-se a intensidade de emissão da solução em 380 nm, quando excitado em 265 nm. As recuperações para a determinação de cetoconazol empregando o procedimento direto de cetoconazol apresentaram variação entre 93,7 a 128%. Desenvolveu-se um procedimento indireto para a determinação de cetoconazol empregando o cério (IV) como agente oxidante. Neste trabalho, monitorou-se a intensidade de emissão do cério(III) produzido da reação de oxidação entre cetoconazol e solução padrão de cério(IV). A intensidade de emissão do cério(III) foi monitorado em 360 nm, quando excitado em 250 nm foi proporcional a concentração do cetoconazol na solução. O procedimento espectrofluorimétrico para a sulfanilamida foi desenvolvido monitorando-se a intensidade de emissão em 345 nm, quando excitado em 245 nm. A recuperação do cetoconazol em amostras de água de torneira procedimento empregando cério(IV) variaram entre 93,0 a 104%. No desenvolvimento do procedimento espectrofluorimétrico para a determinação do antibiótico enrofloxacino monitorou-se a intensidade de emissão do antibiótico em 448 nm, quando excitado em 370 nm. A recuperação na determinação do enrofloxacino em amostras de águas variaram entre 93,3 a 101%, indicando ausência do efeito de matriz nestas amostras. Um procedimento para a determinação de norfloxacino foi proposto utilizando a espectrofluorimetria. Neste caso, a concentração de norfloxacino foi obtida monitorando-se a intensidade de emissão em 446 nm, quando excitado em 370 nm. A intensidade de emissão foi proporcional a concentração do norfloxacino em solução. As recuperações de norfloxacino foi avaliada em amostras de águas e variaram entre norfloxacino 93,9 a 108% em amostras de águas.

Palavras chaves: antibióticos, antifúngicos, validação, águas superficiais.

ABSTRACT

SPECTROFLUORIMETRICS PROCEDURES FOR DETERMINING KETOCONAZOLE, SULFANILAMIDE, ENROFLOXOCIN AND NORFLOXACIN IN WATER SAMPLES. Currently, due to the high intensity of human activities becomes increasingly important the development of analytical procedures for the determination of chemicals with biological activity, particularly in relation to water resources. The high medication and the need for animal productivity increase to supply the market demand, causes the huge amount of disposal of substances with biological activity as effluents or excreted by organisms in the environment. This discharge causes risks of contamination of groundwater and surface waters, directly affecting the ecosystem and consequently, the human health. The aim of this study was to develop and validate analytical procedures for quantifying the presence of drugs ketoconazole, sulfanilamide, enrofloxacin and norfloxacin in water samples using fluorescence spectroscopy methodology. In this work, we seek to employ solvents with low potential for contamination to the environment and analyst targeting the principles of green chemistry. The spectrofluorometric procedure proposed for the direct determination of ketoconazole, monitored is the emission intensity of the solution at 380 nm when excited at 265 nm. Recoveries for the determination of ketoconazole using direct procedure ketoconazole showed variation between 93.7 to 128%. In sequence, the indirect procedure developed for the determination of ketoconazole using cerium (IV) as the oxidizing agent was developed. In this work, the emission intensity of cerium (III) produced in the oxidation reaction between ketoconazole and standard solution of cerium (IV) was monitored. The emission intensity of cerium (III) in solution was monitored at 360 nm when excited at 250 nm. The emission intensity was proportional with the concentration of ketoconazole in the solution. The spectrofluorometric procedure for the sulfanilamide determination was developed by monitoring the emission intensity at 345 nm when excited at 245 nm. The recovery of ketoconazole in tap water samples procedure using cerium (IV) ranging from 93.03 to 104%. In the development of spectrofluorimetric procedure for determining the antibiotic enrofloxacin, the emission intensity of the antibiotic was monitored at 448 nm when excited at 370 nm. The recovery in the determination of enrofloxacin in water samples ranged from 93.3 to 101%, indicating no matrix effect in these samples. The procedure for the determination of norfloxacin was proposed using spectrofluorimetry. In this case, the concentration of norfloxacin was obtained by monitoring the emission intensity of solution at 446 nm when excited at 370 nm. The emission intensity of norfloxacin solution was proportionally to the concentration in solution. The norfloxacin recoveries was evaluated in water samples and ranged from 93.9 to 108% in water samples.

Keywords: antibiotics, antifungal agents, validation, surface water.

SUMÁRIO

Sumário	xi
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1. Matriz ambiental	16
1.1. Cetoconazol.....	18
1.2. Sulfanilamida	20
1.3. Fluorquinolonas.....	23
1.4. Enrofloxacino e Norfloxacino.....	23
1.5. Espectroscopia de fluorescência molecular	25
2. Validação do procedimento analítico	27
2.1. Exatidão.....	27
2.2. Precisão	27
2.3. Linearidade.....	29
2.4. Intervalo ou faixa linear de trabalho	29
2.5. Limites de detecção.....	30
2.6. Limites de quantificação	30
PARTE EXPERIMENTAL	31
3. Instrumentação.....	31
3.1. Reagentes e soluções.....	31
3.2. Procedimentos para a determinação dos analitos por espectrofluorimetria	32
3.3. Determinação da linearidade.....	32
3.4. Estudo de recuperação.....	33
3.5. Procedimento para determinação dos analitos por espectrofluorimetria	33
PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL	33
4. Caracterização espectroscópica do cetoconazol utilizando a matriz de excitação-emissão. Procedimento direto	33
4.1. Efeito da concentração do meio reacional na intensidade do sinal de emissão	35
5. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de cetoconazol	39
5.2. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento direto de cetoconazol	40
5.3. Recuperação de cetoconazol em águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico direto.....	42

Desenvolvimento de um procedimento espectrofluorimétrico para determinação de cetoconazol empregando cério(VI) como agente oxidante.....	45
6. Caracterização espectroscópica do Cetoconazol utilizando a matriz de excitação-emissão. Procedimento oxidativo.	45
6.1. Espectros de excitação e emissão de cetoconazol em Cério(IV)	46
6.2. Caracterização espectroscópica da solução de Cério(IV)	47
6.3. Efeito da concentração de H ₂ SO ₄ sobre a intensidade de emissão da solução padrão de Cério(IV)	48
6.4. Parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação de cetoconazol empregando o procedimento oxidativo.....	50
6.5. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento oxidativo de cetoconazol	51
6.6. Estudo da recuperação de cetoconazol em águas empregando o procedimento oxidativo proposto	53
PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE SULFANILAMIDA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS.....	56
7. Definição do comprimento de onda de excitação utilizando matriz de excitação e emissão (MEE) para a sulfanilamida	56
7.1. Espectros de excitação e emissão de sulfanilamida	57
7.2. Efeito do pH sobre a intensidade do sinal de emissão da sulfanilamida empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto	57
7.3. Parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico	60
7.4. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento de sulfanilamida	61
7.5. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto.....	62
7.6. Estudo da recuperação sulfanilamida em amostras de água	63
Procedimento espectrofluorimétrico para determinação de enrofloxacino em amostras de Águas	65
8. Caracterização espectroscópica da solução do enrofloxacino	65
8.1. Efeito da composição do meio sobre a emissão do enrofloxacino.....	66
8.2. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação do enrofloxacino	67
8.3. Análise dos resíduos em função da concentração da curva analítica para o procedimento para a determinação de enrofloxacino	68
8.4. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico	69

8.5. Estudo da recuperação do enrofloxacino em águas	71
Desenvolvimento de um procedimento espectrofluorimétrico para determinação de norfloxacino em amostras de águas	73
9. Caracterização espectroscópica de solução de norfloxacino	73
9.1. Efeito da composição do meio na emissão do norfloxacino	75
9.2. Parâmetros de confiança analítica do procedimento espectrofluorimétrico para a determinação do norfloxacino	76
9.3. Análise dos resíduos em função da concentração do analito na curva analítica para a determinação de norfloxacino	77
9.4. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de norfloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto	78
9.5. Estudo da recuperação do norfloxacino em águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto	80
Considerações Finais	85
Referências Bibliográficas	86

INTRODUÇÃO

A presença crescente de contaminantes no ambiente é uma preocupação mundial, que vem aumentando devido ao crescimento populacional, juntamente com busca por fontes de água potável, alimentos e combustíveis renováveis. A contaminação de recursos hídricos cresce de forma proporcional ao desenvolvimento tecnológico e criação de novos polos industriais. Dentre os contaminantes ambientais mais encontrados nos últimos anos os fármacos recebem destaque, devido a sua persistência no meio ambiente, tanto em sua forma inicial quanto seus metabólitos, além de metabólitos que sofrem ação do meio ambiente, os quais podem gerar resíduos de grande toxicidade para os seres vivos.

Quando o fármaco entra em contato com o organismo este sofre transformação, total ou parcial originando outras substâncias. O processo de metabolismo ou biotransformação dos fármacos produz compostos com características polares, estes solúveis em água, não sendo absorvidos em sua maior parte nos canais renais. Desta forma, estes metabólitos podem não possuir atividades farmacológicas, ou serem ativos a partir de um fármaco inativo ou reação no meio ambiente. A presença de fármacos residuais no meio ambiente pode acarretar efeitos adversos quando em contato com organismos aquáticos ou quando ingeridos pela população em águas contaminadas. Poucos estudos ainda são desenvolvidos sobre o destino e o comportamento desses compostos em relação ao meio ambiente aquático, assim como quais organismos são afetados e em que grau, nesse sentido dá-se a necessidade do desenvolvimento de novos procedimentos para o monitoramento dessas matrizes ambientais complexas.

Muitos métodos analíticos são desenvolvidos para detectar e quantificar substâncias com princípios farmacológicos em matrizes ambientais complexas, tais como águas superficiais, subterrâneas, esgoto doméstico, efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE), sedimentos marinhos, solo e lodo biológico (CÉSPEDES *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo propor e validar procedimentos para determinação e quantificação de cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxacino e norfloxacino em água, empregando a técnica de espectrofluorimetria, utilizando Cério(IV) como agente oxidante ou, por via direta, empregando a fluorescência intrínseca das substâncias. Os procedimentos foram desenvolvidos visando a diminuição dos gastos

com equipamentos e reagentes, diminuindo a geração de contaminantes para o meio ambiente.

Os fármacos cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxacino e norfloxacino foram selecionados devido à sua enorme utilização no tratamento: antifúngico, antibiótico e antimicrobiano respectivamente. Seus usos têm pouco ou nenhum controle não sendo necessários receituários médicos para a compra, o que tornam seus usos descontrolados, gerando grandes acúmulos no meio ambiente, principalmente aquático, o qual é o alvo deste estudo, para detecção e quantificação destes princípios em matrizes ambientais de água.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Matriz ambiental

A presença de fármacos em matrizes ambientais é conhecida desde a década de 1980, quando Garrison *et al.* (1976) encontraram ácido clofibríco, um metabólito ativo do clofibrato, em amostras de efluente de uma estação de tratamento de água (ETA). Contaminantes emergentes podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas e não possuem uma legislação para regulamentar a concentração máxima permitida no meio ambiente, porém apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (SILVA & COLLINS, 2011). Dentro desta classe de contaminantes se destacam os fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios, subprodutos industriais e drogas ilícitas. Estas substâncias estão amplamente dispersas no meio ambiente, por intermédio das atividades humanas, e são "emergentes" em águas superficiais e subterrâneas, como resultado de emissões industriais, derrames acidentais, aplicação indiscriminada e atividades de consumo assim como excreção e a disposição natural. Os antibióticos no meio ambiente geram grande preocupação por causa do potencial desenvolvimento de resistência bacteriana (EICKHOFF *et al.*, 2009).

Diversas rotas de aporte de fármacos para o ambiente despejam toneladas de compostos com atividades químicas e biológicas ao meio ambiente, sendo a principal fonte o esgoto doméstico (tratado ou bruto) que apresentam esses compostos totais ou parcialmente metabolizados e, por fim, são excretados via urina ou fezes atingindo o sistema de esgotamento sanitário. Os efeitos em águas naturais ainda não são muito conhecidos; entretanto, existe uma grande preocupação em relação à sua presença, que diz respeito aos potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos (HOMEM & SANTOS, 2011). Muitos deles são classificados como desreguladores endócrinos (DE), e conseqüentemente causam danos em um organismo saudável ou em seus descendentes ou subpopulações. Os fármacos, de diversas classes terapêuticas, como antibióticos, antilipêmicos, anti-inflamatórios, analgésicos, fungicida, anti-hipertensivos, entre outros, têm sido detectados em esgotos domésticos, águas superficiais e subterrâneas, em concentrações na faixa de g L^{-1} a ng L^{-1} nas mais diversas regiões do mundo (MELO *et al.*, 2009).

Diversos fármacos usados pelo homem podem ser lançados no meio ambiente, em sua forma metabolizada ou não, atingindo as Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Várias dessas substâncias são persistentes no meio ambiente, não sendo totalmente removidas e resistindo aos processos convencionais de tratamento (RODIL *et al*, 2012).

Outras vias de entrada de fármacos ao ambiente estão relacionadas com o uso veterinário desses compostos, a disposição final de medicamentos não consumidos e com o efluente de indústrias farmacêuticas (FICK *et al*, 2009). A Figura 1 apresenta um resumo das principais rotas de aporte de fármacos ao ambiente

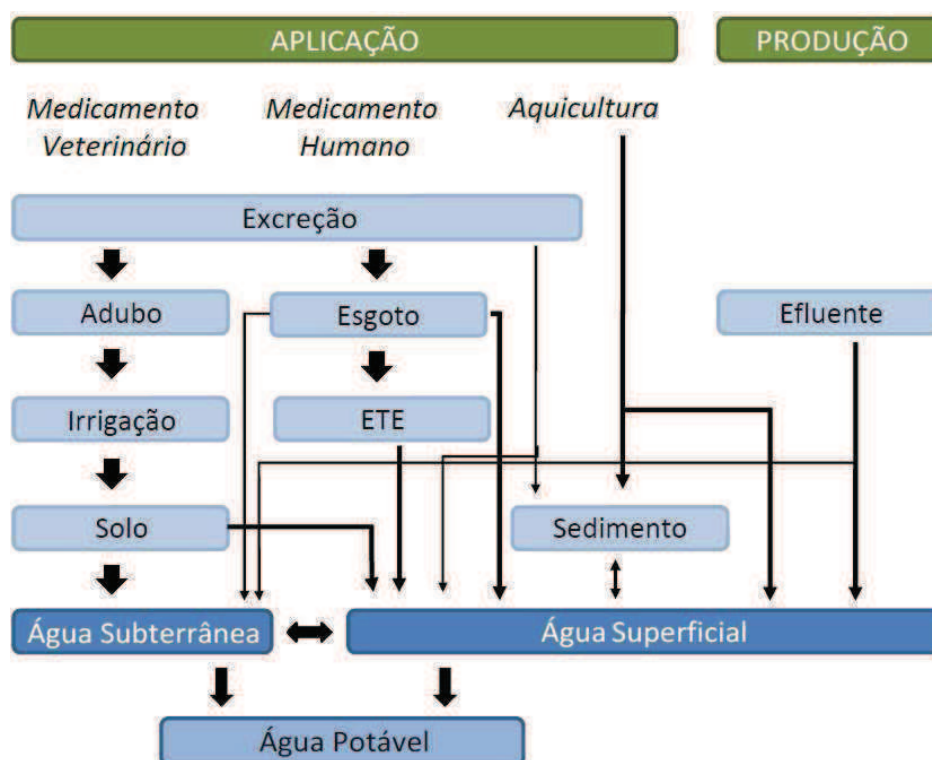


Figura 1. Principais rotas de aporte dos fármacos ao ambiente (adaptado de HIRSCHA *et al*, 1999)

Os efluentes tratados contendo fármacos que não são removidos nas ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto) são lançados no corpo receptor, contaminando rios, lagos e em alguns casos, podendo atingir águas subterrâneas. Ao serem removidos nas ETEs, estes compostos podem ser transferidos para as lamas que são aplicadas na agricultura, podendo contaminar o solo, escoar os seus lixiviados para as águas superficiais, bem como poderá ocorrer sua infiltração, pondo em risco a qualidade das águas subterrâneas (ROQUE, 2009).

O crescente avanço em relação as técnicas analíticas alavancaram o aumento do número do uso de microcontaminantes identificados e quantificados nos efluentes. Como os estudos de monitoramento de microcontaminantes no Brasil em esgotos, águas superficiais e de abastecimento, ainda são incipientes (SOUZA, 2011), vem se tornando uma questão relevante dentro da química analítica e na química ambiental.

A maioria dos fármacos tem suas concentrações na faixa de ng L^{-1} , em matrizes ambientais, devido a sua baixa concentração é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis e que se possível evitem o tratamento de amostras visando a diminuição do tempo de preparo de amostras, custo com reagentes e produção de descartes com potencial tóxico para o meio ambiente.

1.1. Cetoconazol

As infecções fúngicas são um grave problema de saúde pública, uma vez que contribuem substancialmente para a mortalidade humana. Os fungos que são normalmente encontrados em ambientes de ar, solo ou água, são associados a infecções de feridas cutâneas (BERTESTEAN *et al*, 2014).

Todas estas infecções são tratadas com o uso de fármacos antifúngicos. Substâncias do grupo dos azóis são amplamente utilizados como princípio ativo em fármacos antifúngicos para seres humanos e animais, e em formulações de biocidas e fungicidas agrícolas.

O cetoconazol é um derivado imidazólico antifúngico, o qual exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos. Esta ação decorre de sua interferência na síntese de esteróis da membrana, inibindo a formação do ergosterol a partir do seu precursor, o lanosterol. Esta atividade resulta da ação inibitória do cetoconazol (e diversos derivados azólicos) sobre a enzima citocromo da família P-450 (CYP P-450) (PÉREZ-RIVERA *et al*, 2009).

O cetoconazol é utilizado no tratamento de carcinoma prostático e da síndrome de Cushing. Porém, também pode acarretar efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, hepatotoxicidade, tontura, ginecomastia, diminuição da libido, irregularidades menstruais, irritação e ardor no local da aplicação. (VERTOZI *et al*, 2006).

O cetoconazol (CTZ) (cis-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxalan-4-il[metoxi fenil]-peperazina), é um substancia dibásico fraco que tem valores de pKa de 2,9 e 6,5 (LUBACH *et al*, 2013), mostra extensa atividade antifúngica no tratamento de enfermidades humanas, por isso é um dos fármacos antifúngicos mais consumido no Brasil (comparação com outros fármacos antifúngicos).

Portanto, resíduos de cetoconazol e de outros fármacos são comumente encontrados no meio ambiente. Os medicamentos antifúngicos a base de azóis são utilizados via tópica, oral ou intravenosa. A aplicação tópica de produtos farmacêuticos gera resíduos dos princípios ativos, devido à baixa absorção da pele (LETZELA *et al*, 2009). O uso extensivo de fármacos pode levar a quantidades substanciais de resíduos de substâncias do grupo dos azóis no meio ambiente.

Medicamentos de uso humano e veterinário são excretados como metabólitos após seu consumo e podem ser inseridos no meio ambiente por diversas fontes como; descarga de águas residuais tratadas e não tratadas, lixiviação do solo, descarte incorreto de medicamentos por parte da população e das indústrias farmacêuticas. Além disso, uma parte do medicamento também é excretada em sua forma inalterada. Alguns medicamentos de uso veterinário também podem ser inseridos no meio ambiente por escoamento de produção agrícola. Na literatura estão relatados poucos efeitos adversos graves para a saúde humana devido as concentrações em níveis de traço dos resíduos farmacêuticos individuais. O questionamento principal sobre estes resíduos permanece em torno dos efeitos crônicos e potenciais das misturas dos produtos farmacêuticos e outros contaminantes ambientais. Estudos demonstram também impactos com potencial negativo de resíduos de cetoconazol e outros antifúngicos no sistema endócrino dos organismos aquáticos (ANKLEY *et al*, 2005).

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de cetoconazol em matrizes ambientais, farmacêuticas e amostras biológicas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VERTZONI *et al*, 2006) é o método mais empregado, porém tem elevado custo de manutenção, necessita de tratamento de amostras, gera resíduos com potencial de contaminação ao meio ambiente e são necessários treinamentos dos usuários antes do início da utilização do cromatógrafo. Além da cromatografia, também são empregadas as técnicas de espectroscopia molecular na região UV-Vis, de potenciometria, eletroforese, e de voltametria cíclica, na determinação de cetoconazol (PROENÇA *et al*, 2007). Em geral, as técnicas citadas

acima requerem um preparo de amostra com diversas etapas que envolvem filtração e pré-concentração das matrizes, tornando os procedimentos morosos.

No entanto, a disponibilidade de métodos analíticos simples que envolvam aparelhagem de baixo custo e fácil manuseio para a determinação do cetoconazol é de suma importância para as indústrias farmacêuticas e para o controle de fármacos no meio ambiente.

Embora diversos procedimentos analíticos estejam disponíveis na literatura, o procedimento desenvolvido neste trabalho poderá ser utilizado como método alternativo para a determinação de cetoconazol, pois é simples, rápido, não requer o tratamento de amostras. Quando houver a presença de material particulado em suspensão nas amostras, estas devem ser filtradas antes da diluição com a solução ácida.

1.2. Sulfanilamida

A presença de fármacos e seus metabólitos no meio ambiente tornou-se preocupação crescente nos últimos anos (PETRIE *et al*, 2015) especificamente, os antibióticos, os quais constituem o grupo mais prevalente de drogas persistentes. Uso de micro poluentes estão intimamente relacionados com o potencial de perturbação dos ciclos bacterianos, agricultura e produção animal, o que têm relação direta com efeitos adversos à saúde humana e ecológica (KORZENIEWSKA *et al*, 2013). Os antibióticos têm sido relatados em águas residuais de hospital, estação de tratamento de águas residuais (ETAR), efluentes, águas subterrâneas, sedimentos, biota e água potável (DOLLIVER *et al*, 2007)

Antibióticos a base de sulfonamidas (SAs) têm sido frequentemente detectados em baixas concentrações (<1 ppb) em ambientes aquáticos o que vem causando preocupação. Compostos farmacológicos e seus metabólitos, não recebem tratamentos adequados ou são mal removidas por sistemas de tratamento de águas residuais municipais e industriais convencionais. Tal contaminação está relacionada com efeitos diretos sobre organismos que recebem corpos d'água e ao potencial gerador em resistência aos antibióticos (KÜMMERER, 2009).

A alta eficiência de SAs e seu custo relativamente baixo têm estimulado o seu intenso uso nas práticas veterinárias. SAs são empregados na medicina veterinária, em formulações puras ou combinação com outros antibióticos, não só para combater doenças

infecciosas, mas como aditivos para rações animais, a fim de promover o crescimento e aumentar a produtividade de gados e aves, apesar do fato de a utilização de antibióticos para esta finalidade ser proibida em diversas partes do mundo (BARAN et al, 2011). Na maioria dos países, os limites máximos de resíduos para o total SAs nos alimentos são: 100 mg kg⁻¹ para a carne e mel e 100 mg L⁻¹ para o leite. De acordo com Baran (2011), o consumo de SAs em 2009 mg por kg de carne produzida na Dinamarca foi de 4,82 (carne de porco), 17,2 (gado), 0,033 (frangos) e 58,5 (peixe), sendo a taxa de contaminação dos peixes aproximadamente 4 vezes maior que a do gado, demonstrando a necessidade de pesquisas para detecção e determinação de SAs nos leitos dos rios. A União Européia (UE) estabeleceu um limite máximo de resíduos de 100 mg kg⁻¹ para a soma de todas as sulfonamidas em leite, tecidos e músculos de animais (Comissão Européia, 2010).

A sulfanilamida contém um anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4, respectivamente. O grupo amino na posição 4 confere para a molécula atividade bacteriana enquanto que modificações no radical unido ao carbono 1 do anel benzênico modificam as características farmacológicas do composto. Suas propriedades antibacterianas foram descobertas por G. Domagk em 1935. A base para a sua ação bacteriostática é a semelhança estrutural entre a sulfanilamida e o ácido p-aminobenzóico (PABA), que está envolvida na biossíntese do ácido dihidrofólico e fólico e outras substâncias utilizadas pelos microrganismos (BARAN et al, 2011). Apenas os microrganismos que sintetizam o seu próprio ácido dihidrofólico sofrem ação bacteriostática pela SAs, já microrganismos e células que utilizam ácido dihidrofólico como um produto acabado não são sensíveis à SAs.

Métodos analíticos para a detecção e determinação de resíduos de SAs podem ser classificados em três grupos: quantitativa, confirmação e triagem. Os métodos quantitativos são baseados principalmente em cromatografia e eletroforese capilar e permite a quantificação das SAs. No entanto, estes métodos geralmente requerem procedimentos complexos de tratamento de amostras, equipamento de laboratório complexo e operadores treinados, sendo métodos onerosos e de alto custo financeiro. A principal característica dos métodos de confirmação é a sua capacidade para identificar com segurança um composto. Os métodos de rastreio podem detectar um analito ao nível de interesse e fornecem resultados semi-quantitativos. Eles são projetados especificamente para evitar resultados falsos compatíveis (EMEA, 2008).

Em geral, os métodos relatados para a determinação SAs podem ser agrupados de acordo com o tipo de técnica analítica aplicada, sendo o HPLC-MS-MS o mais empregado, (FEDOROVA *et al*, 2014) seguido pelo HPLC com outros detectores (GRANJA *et al*, 2012). As principais desvantagens destes métodos estão ligadas principalmente a sua complexidade e ao elevado custo dos equipamentos, sendo um método altamente recomendável para a análise de confirmação, mas não para fins de grande número de amostras de rastreio, uma vez que é muito caro e demorado, tal fato estimula o desenvolvimento de métodos de rastreio baseados em técnicas mais baratas e menos complexas. A técnica de eletroforese (YE *et al*, 2013), é empregada para determinação de SAs têm diversas vantagens dentre as quais sua alta recuperação, baixo tempo de extração, elevado fator de enriquecimento, baixo custo e baixo consumo de solventes orgânicos (SHI *et al*, 2011). Tais métodos exigem analistas qualificados, são onerosos e demandam grande quantidade de tempo, portanto, de uso limitado como métodos de primeira ação que envolva protocolos complicados de extração, concentração e separação, seguido pela identificação e quantificação utilizando ferramentas especializadas, e de alto valor para aquisição e manutenção. Neste sentido, ensaios rápidos, sensíveis e específicos são exigidos para detectar amostras positivas de sulfanilamida em análises de rotina, que, em seguida, pode ser confirmado por métodos de referência.

A técnica de espectroscopia molecular (CATELANI *et al*, 2014; KLOKOVA *et al*, 2008), tem como principais vantagens velocidade de análise e seletividade potencial quando acoplados com técnicas de análise de dados quimiométricos. A espectroscopia por fluorescência (ABELLÁN *et al*, 2014), tem como vantagem a ausência de pré-tratamento de amostras, tempo de análise mais curto, redução de consumo de solventes, excelente sensibilidade da detecção por fluorescência, alternativa de baixo custo, e a aplicação de derivadas possibilita minimizar os problemas com interferentes, sem complicados procedimentos de separação ou extração prévios, bem como não necessita de padrões ultrapuros exigidos na cromatografia líquida de alta eficiência, além da grande possibilidade da validação do método no doseamento simultâneo (PASCHOAL *et al*, 2003).

Este trabalho demonstra o desenvolvimento de um procedimento analítico para detecção e quantificação de sulfanilamida em matrizes ambientais, utilizando um sistema espectrofluorimetria.

1.3. Fluorquinolonas

As quinolonas fazem parte da classe dos antibióticos sintéticos, que são empregados amplamente no uso humano e veterinário, são de grande importância ao combate de organismos Gram positivos (*Staphylococcus* spp.) e negativos, (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Moraxella catarrhalis* e *P. aeruginosa*) (PINA, 2000), são efetivas contra bactérias anaeróbicas. As fluorquinolonas são obtidas a partir da adição de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo das quinolonas, o que aumenta sua atividade antibacteriana. Surgindo na década de 80, com modificações na posição 6 (átomo de flúor) e 7 (grupo piperazinil), o norfloxacino e o enrofloxacino, sendo o último de uso exclusivo em veterinária (MARTINEZ et al., 2006), apareceram como importantes opções para os tratamentos antibacteriano.

As fluorquinolonas são metabolizadas no fígado, são excretadas majoritariamente na urina, e na bile, nas duas formas em altas concentrações como substância ativa (PINA, 2000). Na medicina humana, têm sido descritas reações de fotossensibilidade (prurido, rash cutâneo, eritema e urticária), interações medicamentosas, efeitos sobre o sistema nervoso central (ataxia, crises epiléticas, desvanecimentos, insônia, sonolência e tremores) e cristalúria (conduzindo à uropatia obstrutiva). Muitos dos efeitos adversos citados também têm sido descritos para cães e gatos (BOLON, 2009).

1.4. Enrofloxacino e Norfloxacino

As 4-quinolonas ou quinolonas representam uma classe de compostos sintéticos eficazes no tratamento de uma série de infecções, principalmente as de origem bacteriana. Possuem um largo espectro de atividade antimicrobiana, potência elevada, boa disponibilidade biológica, formulações oral e intravenosa e uma baixa incidência de efeitos secundários (EMAMI et al., 2005). As quinolonas podem ser classificadas nas várias gerações com base no seu espectro de ação.

Os compostos de segunda geração surgiram na década de 80 com a inclusão de um átomo de flúor na posição R₆ e um anel piperazina na posição R₇. Estas modificações estruturais aumentaram, consideravelmente, o espectro de ação das quinolonas, dando origem a uma nova classe de compostos chamada fluorquinolonas. Estes compostos possuíam uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger

algumas espécies Gram-positivas e atingiram um perfil farmacocinético melhor, com uma atividade antibacteriana mil vezes superior a observada pelo ácido nalidíxico (VIEIRA et al., 2010; SOUZA, 2005).

O enrofloxacino recebe o nome de (ácido 1,4-diidro-1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-4-oxo-3-quinolinacarboxílico), foi sintetizada em 1980 pelos pesquisadores GROHE e PETERSON, da Bayer, sendo desenvolvida exclusivamente para o uso na medicina veterinária, é um antimicrobiano de amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias como rickétsias, clamídeas, micoplasmas como também para as bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo aquelas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e sulfonamidas (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004)

O norfloxacino recebe o nome de (ácido-1-etil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico), no Brasil o norfloxacino teve sua liberação regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em junho de 1983, (BRASIL, 2012). O norfloxacino sofre metabolização parcial no fígado, aproximadamente 20% e tendo a via renal como fonte principal de excreção. Aproximadamente 50% da dose administrada pode ser recuperada nas fezes, sendo esta a via de eliminação do fármaco não absorvido pelo organismo. (KATZUNG, 2005). Seu emprego no tratamento de doenças provocadas por micro-organismos Gram-negativos e patógenos atípicos, que causam infecções gênito-urinárias, gastroenterites agudas bacterianas como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus* no tratamento de infecções oculares e contra febre tifoide, e alguns organismos Gram-positivos (WAGENLEHNER et al., 2011).

O enrofloxacino e o norfloxacino tem em comuns as seguintes características: pós brancos a amarelos claros, pouco solúveis em água, metanol, etanol, acetato de etila e acetona, facilmente solúveis em ácido acético. Possuem como mecanismo de ação a interferência da síntese do DNA bacteriano, inibindo a atuação de 2 enzimas: DNA-girase e a Topoisomerase IV, as quais são responsáveis pelo controle do processo de divisão e reunião de novas cadeias e no enovelamento do novo DNA durante sua replicação (BARREIRO & FRAGA, 2008). Entre os principais efeitos colaterais destacam-se: gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), toxicidade ocular, cegueira por degeneração retiniana difusa, reações alérgicas, reações na pele, dores nos tendões (tendinite; ruptura do tendão), distúrbios mentais, alteração na audição.

Em pesquisa realizada no Paraná, observou-se que o enrofloxacino é um dos ingredientes ativos mais utilizados como preventivo de doenças. Atualmente a Agência de Alimentos e Drogas (FDA) apoia o uso no tratamento de animais de companhia e animais de corte (AHN et al., 2012). O uso no Brasil do enrofloxacino como aditivo alimentar ou como conservante de alimento para animais é proibido pelo Ministério da Agricultura. A enrofloxacino e a norfloxacino apresentam potencial de toxicidade ecológico e risco para a saúde humana, classificadas como compostos de “médio” e “muito alto” risco. Uma vez que a enrofloxacino e norfloxacino são excretadas por animais na água ou sedimentos, elas acabam sendo submetidas à transformação ou degradação a diferentes taxas, dependendo da natureza dos fatores, bióticos, abióticos e ambientais (LIN *et al.*, 2010). Estes compostos têm sido encontrados no meio ambiente em concentrações médias típicas de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ nos EUA. No Brasil a concentração média dos antibióticos giram em torno de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em estações de tratamento de esgoto (ETE). Nos rios, as concentrações médias encontradas variam entre $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ (BILA e DEZOTTI, 2003).

1.5. Espectroscopia de fluorescência molecular

A fluorescência é um processo fotoluminescente no qual as moléculas absorvem energia na forma de radiação eletromagnética e ao relaxarem para seu estado fundamental liberam o excesso de energia absorvido na forma de fótons (SKOOG et al, 2007). A fluorescência de uma amostra é medida em diversos comprimentos de onda de emissão para diversos comprimentos de onda de excitação, obtém-se uma superfície ou matriz de excitação-emissão (MEE). Desta maneira, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, sendo que uma destas dimensões se caracteriza pelos perfis de excitação e a outra possui informação referente ao espectro de emissão. O agrupamento destes espectros gera uma superfície tridimensional de fluorescência, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes (TREVISAN & POPPI, 2003).

Um fator relevante que pode estar presente em espectros de fluorescência, é a supressão de fluorescência (*quenching*). A supressão refere-se a qualquer processo que cause redução do rendimento quântico de um sistema luminescente. Ela ocorre devido à interação do fluoróforo com determinadas substâncias denominadas supressores.

Elevadas concentrações dos fluoróforos podem também gerar dois tipos de supressão: (i) auto supressão e (ii) auto absorção. No primeiro caso, as moléculas excitadas transferem energia às moléculas do solvente, diminuindo a intensidade das bandas de fluorescência. A auto absorção ocorre quando existe sobreposição das bandas de excitação e emissão de fluorescência, de modo que a radiação emitida é absorvida para excitação de outras moléculas, chegando apenas parte da radiação emitida ao detector (HOLLER *et al*, 2009).

O estado excitado de uma molécula, gerado pela absorção de luz é um estado energeticamente mais rico que o respectivo estado fundamental, a dissipação deste excesso de energia pode ocorrer por meio de processos não radioativos ou processos radioativos, no primeiro caso a dissipação dá-se pela perda de calor e no segundo pela emissão de luz. O processo de formação e desativação dos estados excitados de átomos e moléculas pode ser convenientemente representado através do diagrama de Jablonski (Figura 2) (LAKOWICZ, 1983). Utilizando este diagrama as energias relativas aos estados envolvidos assim como os processos de desativação radiativos e não radiativos são mostradas.

O diagrama demonstra quais são os processos físico que podem ocorrer durante o período que uma molécula absorve um fóton com energia entre os comprimentos de onda do ultravioleta e visível. Sendo S_0 é o estado eletrônico fundamental, S_1 , e T_1 os estados excitados singleto e tripleto de menor energia, respectivamente. Assim como S_2 é um segundo estado excitado singleto. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas as transições não-radiativas (HOLLER *et al*, 2009).

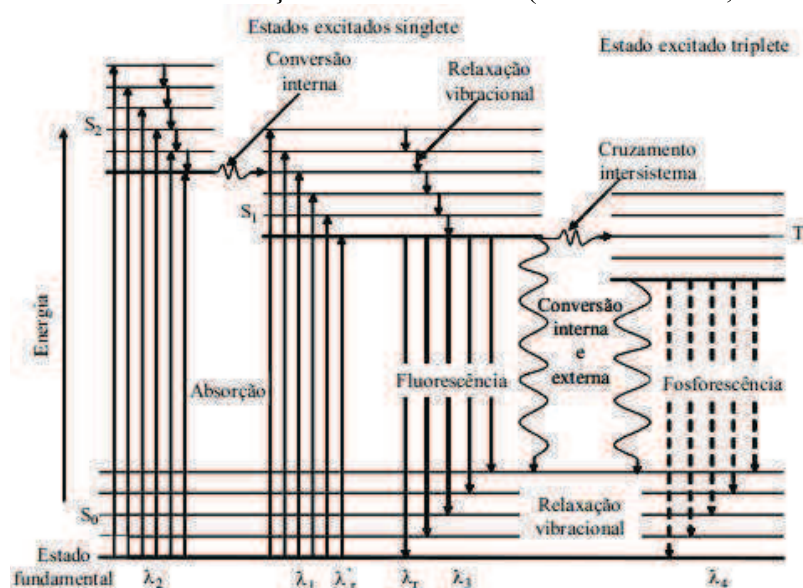


Figura 2. Diagrama de Jablonski (adaptado HOLLER *et al*, 2009).

As moléculas que apresentam fluorescência e/ou fosforescência são chamadas de luminescentes. A caracterização dos processos que conduzem à formação e desativação dos estados excitados deve considerar dois parâmetros: as constantes de velocidade e os rendimentos quânticos. A magnitude destes dois parâmetros determinará as propriedades fotoquímicas intrínsecas da molécula.

Matrizes biológicas apresentam grandes concentrações de proteínas, sendo que muitas destas proteínas causam supressão de fluorescência, principalmente devido à presença de aminoácidos fluorescentes. A supressão nestes sistemas dá-se de diversas formas, mas o principal efeito ocorre devido à auto absorção do sistema, bem como pelas interações peptídicas entre os fluoróforos (LÓPEZ et al, 2010). Existem alguns procedimentos utilizados para se eliminar o efeito de supressão ou reduzi-lo, minimizando a sua interferência nas análises. Em meios com elevada concentração de proteínas, a separação destas proteínas é um dos procedimentos mais empregados, embora possam ocorrer consideráveis perdas na recuperação. Outra possibilidade é a diluição das amostras, o que a princípio parece ser mais interessante, pois não envolve etapas mais requintadas de preparação da amostra (TREVISAN & POPPI, 2003). A fluorescência molecular se destaca, dentre os outros métodos, devido a sua alta sensibilidade, que pode chegar a até três ordens de magnitude maior que em outros métodos espectroscópicos de absorção, sua ampla faixa linear de concentração, que também é significativamente maior que nos métodos de absorção. Apesar de suas mais diversas vantagens em análises químicas e biológicas os métodos de fluorescência são menos empregados que os de absorção em razão do número limitado de sistemas fluorescentes. (HOLLER *et al*, 2009).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver e validar uma metodologia analítica para detecção e determinação de resíduos de fármacos em águas, entre eles cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxacino e norfloxacino, utilizando a técnica de Espectroscopia de Fluorescência.

2. Objetivos específicos

- Desenvolver a metodologia para identificação e quantificação dos fármacos, cetoconazol, sulfanilamida, enrofloxacino e norfloxacino em águas superficiais, potáveis e subterrâneas por Espectroscopia de Fluorescência;
- Validar a metodologia de quantificação dos compostos quanto à exatidão, precisão, linearidade, limite de quantificação e detecção, garantindo que os resultados apresentados sejam confiáveis e adequados à qualidade pretendida;
- Aplicar o procedimento desenvolvido para determinar os níveis de concentração de antibióticos e antifúngicos, a fim de avaliar possíveis contaminações de águas superficiais e potáveis, assim como verificar a eficácia do procedimento proposto.

3. Validação do procedimento analítico

3.1. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico é a proximidade que os resultados experimentais obtidos têm em relação aos valores matematicamente calculados (ANVISA, 2003). Importante observar que os valores matematicamente calculados são medidas obtidas por um processo perfeito, sendo este valor, então impossível de se obter, deste modo tal valor estimado e convencionalmente aceito como verdadeiro (INMETRO, 2007). A exatidão pode ser estabelecida verificando-se os valores em relação a faixa específica de linearidade para cada procedimento desenvolvido. (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

3.2. Precisão

A análise de precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos após uma série de medidas de uma amostragem múltipla de um mesmo analito (ANVISA, 2003). De acordo com o INMETRO (2007) precisão é um termo geral empregado quando se pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de um

mesmo analito, de analitos semelhantes ou de padrões, em condições definidas. Segundo WOOD (1999), a precisão (ou desvio-padrão relativo) está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, definido pela equação: $CV (\%) = 2 \times (1 - 0,5 \log C)$, na qual C é a concentração do analito. Desse modo, substituindo-se os níveis de concentração nessa equação obtém-se os valores de precisão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito (m/m)

Concentração do analito (%)	Coefficiente de variação (%)
1 (100%)	2
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

Fonte: Adaptado de WOOD, 1999

Existem três parâmetros que podem ser empregados para a precisão: repetibilidade (ANVISA, 2003) ou repetitividade (INMETRO 2007), reprodutibilidade e precisão intermediária. Repetibilidade ou repetitividade é grau de correlação entre os dados de sucessivas medidas de um mesmo mensurando, os quais devem ser efetuados em um curto espaço de tempo, por um mesmo analista, mesmo equipamento, mesmas condições ambientais e mesmo procedimento padrão (ANVISA, 2003; INMETRO 2007).

Reprodutibilidade é a concordância entre os resultados determinados por diferentes laboratórios, como em estudos colaborativos, os quais são usualmente aplicados à padronizações de procedimentos analíticos (ANVISA, 2003).

Precisão intermediária é a correlação entre os resultados de um mesmo laboratório, porém os quais tem seus dados obtidos em dias distintos, com analistas distintos e/ou equipamentos distintos (ANVISA, 2003).

3.3. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade das respostas obtidas experimentalmente as quais espera-se um comportamento diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, em diferentes concentrações dentro de determinada faixa. Para sua construção se faz necessário um número mínimo de 5 (cinco) concentrações as quais são recomendado pela Resolução (RE) n° 899 da ANVISA (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A linearidade é obtida empregando a padronização interna ou externa a qual é formulada pela equação matemática aplicando-se no cálculo da concentração do analito de interesse na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis pode ser descrita de tal maneira:

$$y = a \times x + b$$

Onde: y= resposta medida (intensidade do sinal); x=concentração; a=inclinação da curva de calibração=sensibilidade; b=intersecção com eixo y, quando x=0 (INMETRO, 2007).

Para que confirmar a validação da equação que descreve a curva analítica se faz necessário a avaliação de variância existente na curva empregando-se o gráfico de resíduos.

3.4. Intervalo ou faixa linear de trabalho

Os valores para a faixa linear de trabalho correspondem à faixa do maior ao menor nível de concentração do analito, o qual é estipulado a partir do parâmetro de linearidade.

Os limites percentuais que devem estar contidos na faixa linear para alguns métodos analíticos estão expostos na Tabela 2, seguindo as normativas definidas pela ANVISA (2003).

A correlação entre o sinal medido e a concentração é obtida experimentalmente e pode ser expressa a partir da equação de reta da curva analítica, cujos coeficientes podem ser determinados a partir da análise por regressão linear.

Tabela 2. Limites de intervalo utilizados na validação de metodologia analítica (ANVISA, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste.
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo.

A faixa de trabalho deve abranger todo o intervalo de aplicação para a qual o ensaio de quantificação pretende-se empregar. A concentração do analito deve preferencialmente, sempre que viável, estar ao centro ou o mais próximo possível do centro da faixa linear (INMETRO, 2007)

3.5. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato sob as condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2010; ANVISA 2003). Os cálculos teóricos devem ser empregados como ponto de partida para realização dos testes práticos do LD, pois o método pode apresentar distúrbios os quais impossibilitam a detecção da concentração calculada de analito. Na prática, este valor é determinado como a menor concentração de analito que pode ser diferenciada do ruído do equipamento com segurança.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Para que exista precisão do LQ é necessário um valor inferior a 10% e uma exatidão de $\pm 10\%$. O cálculo teórico deve ser utilizado como ponto de partida para realizar o teste prático LQ do método, pois o método pode não ser efetivamente capaz de quantificar as concentrações calculadas de analito.

PARTE EXPERIMENTAL

4. Instrumentação

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se balança analítica Bel Engineering modelo M214Ai com precisão de $\pm 0,10000$ mg. Um banho ultrassônico (Cristófilo) foi utilizado para dissolução dos reagentes.

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

As medidas de emissão 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.

4.1. Reagentes e soluções

A solução estoque de cetoconazol $1,9 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 25 mg de cetoconazol (Galena, Campinas-SP, lote KET/M-10610, 99% pureza) em balão volumétrico de 25,0 mL e completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹.

As soluções de trabalho de cetoconazol ($5,0 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foram preparadas diluindo-se volumes da solução estoque em balões volumétricos de 5,0 mL, completou-se com solução de ácido sulfúrico.

A solução estoque de sulfanilamida $5,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 25 mg de sulfanilamida (Sigma - Aldrich, lote 1105885, 99% pureza) em balão volumétrico de 25,0 mL, utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

As soluções de trabalho de sulfanilamida ($6,6 \times 10^{-6}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram preparadas diluindo-se volumes da solução estoque em balões volumétricos de 5,0 mL, completou-se com ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

A solução estoque de enrofloxacino de $3,10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 25 mg de enrofloxacino em balão volumétrico de 25,0 mL, utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,0010 mol L⁻¹.

As soluções de trabalho de enrofloxacino ($7,4 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram preparadas diluindo-se volumes da solução estoque em balões volumétricos de 5,0 mL, completou-se com ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹.

A solução estoque de norfloxacino de $3,10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 25 mg de norfloxacino em balão volumétrico de 25,0 mL, utilizando-se solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹.

As soluções de trabalho de norfloxacino ($1,9 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram preparadas diluindo-se volumes da solução estoque em balões volumétricos de 5,0 mL, completou-se com ácido clorídrico 0,0010 mol L⁻¹.

A solução de ácido sulfúrico (Vetec, 99%) 1,0 mol L⁻¹ foi preparada pipetando-se 53,8 mL do respectivo ácido em balão volumétrico de 1,0 L, completando-se com água destilada. Foram preparadas soluções nas concentrações de: 0,001; 0,01; 0,10 e 1,0 mol L⁻¹ por diluição seriada a partir da solução estoque de 1,0 mol L⁻¹.

A solução de ácido clorídrico (Vetec, 37%) 1,0 mol L⁻¹ foi preparada pipetando-se 53,8 mL do respectivo ácido em balão volumétrico de 1,0 L⁻¹, completando-se com água destilada. Foram preparadas soluções nas concentrações de: 0,001; 0,01; 0,10 e 1,0 mol L⁻¹ por diluição seriada a partir da solução estoque HCl 1,0 mol L⁻¹.

A solução estoque de nitrato de cério(IV) $1,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 25 mg em balão volumétrico de 25,0 mL, completou-se com solução de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹.

4.2. Procedimentos para a determinação dos analitos por espectrofluorimetria

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de excitação e emissão do cetoconazol e sulfanilamida, efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o λ de excitação em 250 nm e monitorando-se a emissão entre 200 a 500 nm. Os espectros de emissão foram obtidos para solução de estoque de cetoconazol $1,90 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em ácido sulfúrico de 0,10 mol L⁻¹, e sulfanilamida $5,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

As fendas de emissão e de excitação, bem como os filtros foram estabelecidos de modo a fornecer maior sinal analítico. As fendas de excitação e de emissão foram selecionadas em diferente nm a tensão do tubo fotomultiplicador variou entre 450 e 600V.

4.3. Determinação da linearidade

O estudo do intervalo da linearidade de trabalho foi determinado empregando-se das condições de concentração do meio reacional, λ de excitação e emissão máximos já otimizados. A faixa linear da curva analítica foi determinada considerando-se a regressão linear, entre os valores de intensidade de emissão e concentração da solução padrão, pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (r), adotando o parâmetro $r > 0,99$ como aquele que define a faixa linear (VELIKINAC et al, 2004).

Os resíduos obtidos da curva analítica serão avaliados estudando-se o gráfico dos resíduos em função da concentração do analito a partir dos dados das curvas analíticas. Com os dados das curvas analíticas, calcula-se o desvio-padrão da regressão (s_y), valor este que devem ser inferiores a duas vezes o desvio padrão da regressão ($2 \times s_y$) fato que evidencia a ausência de outliers ou anomalias (SILVA et al, 2011).

Avaliou-se significância estatística da equação de regressão obtida na curva analítica obtendo-se a ANOVA, para avaliar a existência da relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração. Verifica-se a existência da relação de linearidade entre a intensidade da fluorescência estatisticamente significativa (TRIOLA, 2005).

4.4. Estudo de recuperação

Para avaliação do estudo da recuperação, em relação a interferência da matriz de amostra na determinação do analito. Diferentes alíquotas da referência do analito foram adicionadas em soluções contendo 10% do volume da matriz avaliada. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência do analito, foram comparados com a quantidade do analito adicionado na matriz ambiental.

4.5. Procedimento para determinação dos analitos por espectrofluorimetria

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de excitação e emissão do cetoconazol e sulfanilamida, efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o λ de

excitação em 250nm e monitorando-se a emissão entre 200 a 500 nm. Os espectros de emissão foram obtidos para solução de estoque de cetoconazol $1,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e sulfanilamida $5,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

As fendas de emissão e de excitação, bem como os filtros foram estabelecidos de modo a fornecer maior sinal analítico. As fendas de excitação e de emissão foram selecionadas em diferente nm a tensão do tubo fotomultiplicador variou entre 450 e 600V.

PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL

5. Caracterização espectroscópica do cetoconazol utilizando a matriz de excitação-emissão. Procedimento direto

A definição do comprimento de onda a ser utilizado para a excitação e emissão do cetoconazol (CTZ) foi obtida empregando-se uma solução padrão de cetoconazol na concentração de $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A matriz de excitação-emissão (Figura 3), foi obtida empregando-se os valores dos espectros de emissão que variaram seu λ de excitação de 200 a 500 nm, e de emissão entre 200 a 400 nm com intervalos de 5 nm. Verificou-se na matriz obtida que o comprimento de onda de excitação máxima está em $\lambda_{\text{ex}} = 265 \text{ nm}$, enquanto o de emissão máxima está em $\lambda = 380 \text{ nm}$.

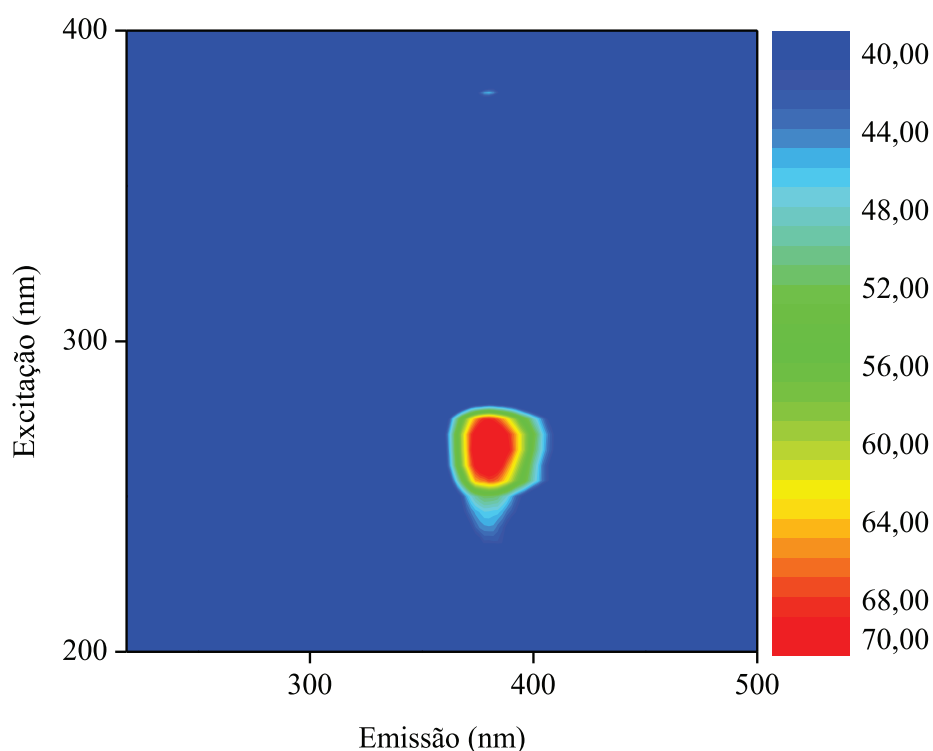


Figura 3. Matriz de excitação-emissão de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

Na sequência, obteve-se um espectro de emissão e excitação de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4), para verificar os comprimentos de onda das transições nativas. Observou-se que fluorescência do cetoconazol tem seu λ de excitação e emissão em 265 nm e 380 nm, respectivamente. Verifica-se a simetria do espectro, que é resultado pelo fato das mesmas transições estão envolvidas tanto no processo de absorção, quanto no de emissão.

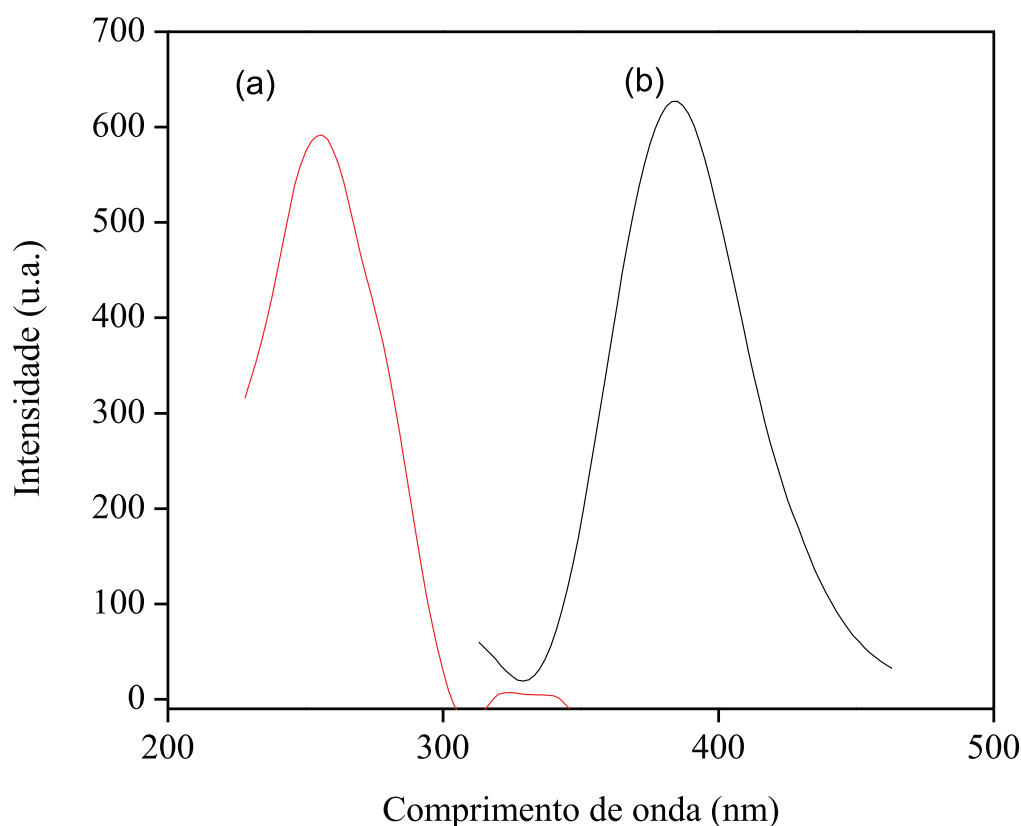


Figura 4. Espectro de excitação (a) e emissão (b) de Cetoconazol $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

5.1. Efeito da concentração do meio reacional na intensidade do sinal de emissão

A fluorescência da substância varia de acordo com o solvente empregado, sendo os principais efeitos verificados é a constante dielétrica do solvente (ϵ), associação entre solvente e soluto pela formação de ligação de hidrogênio, supressão pelas moléculas do solvente e a ionização das moléculas (WILLIAMS e BRIDGES, 1964).

Avaliou-se o efeito da concentração e tipo de ácido do meio sobre o sinal de emissão do cetoconazol em diferentes concentrações de ácidos (HCl e H₂SO₄). Foi avaliado o efeito da concentração de H⁺ sobre o sinal de emissão de uma solução padrão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-5}$, em concentrações que de: 0,001 a 1,0 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico e ácido clorídrico. Os efeitos das concentrações sobre as intensidades de fluorescência nos espectros de emissão são apresentados na Figura 5.

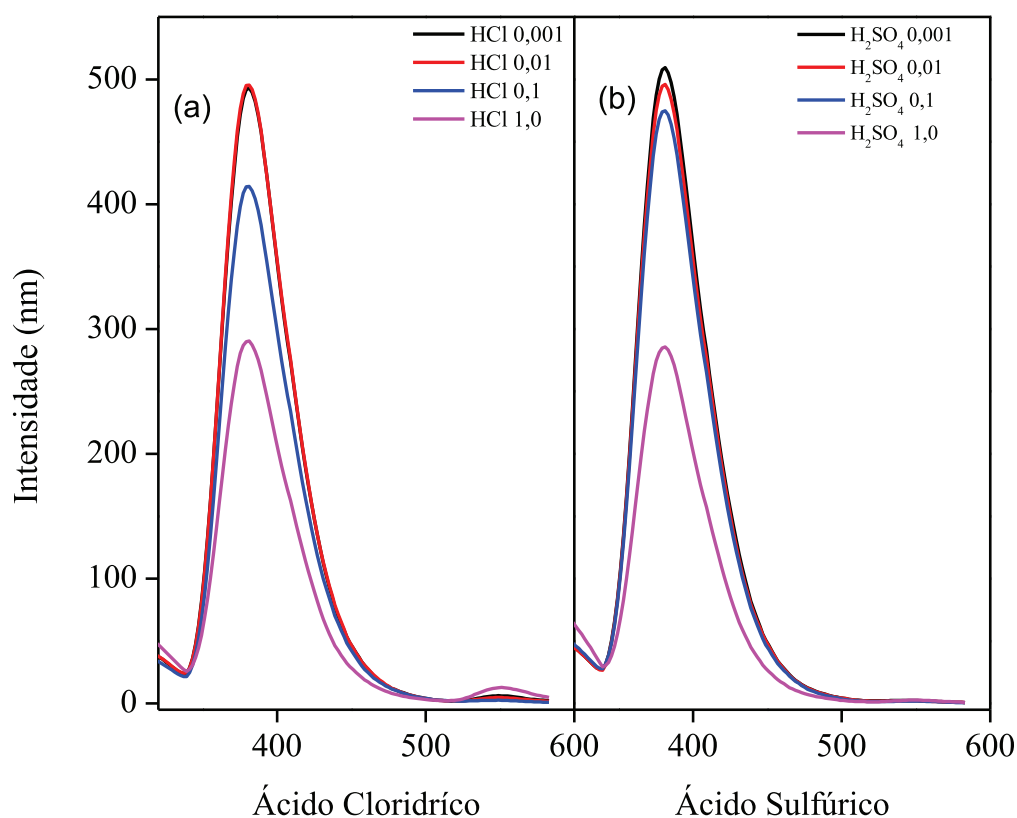


Figura 5. Influência da concentração sobre a intensidade de emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n=3). $\lambda_{\text{excitação}}=265$ nm, (a) ácido clorídrico, (b) ácido sulfúrico.

Verificou-se nos espectros de cetoconazol (Figura 5) que diferentes concentrações de ácido sulfúrico e clorídrico não promoveram o deslocamento do λ tanto para o aumento do sinal (batocrômico) ou diminuição (hipsocrômico), permanecendo a emissão em 381 nm. Observou-se que a intensidade de emissão sofreu supressão com o aumento da concentração. Tal efeito pode ser devido ao fato da protonação do fármaco devido ao aumento da concentração no meio reacional o que torna o fluoróforo do cetoconazol menos reativo. O ácido sulfúrico na concentração de 0,01 mol L⁻¹ demonstrou maior sinal (Figura 6) de intensidade, selecionado para os experimentos seguintes.

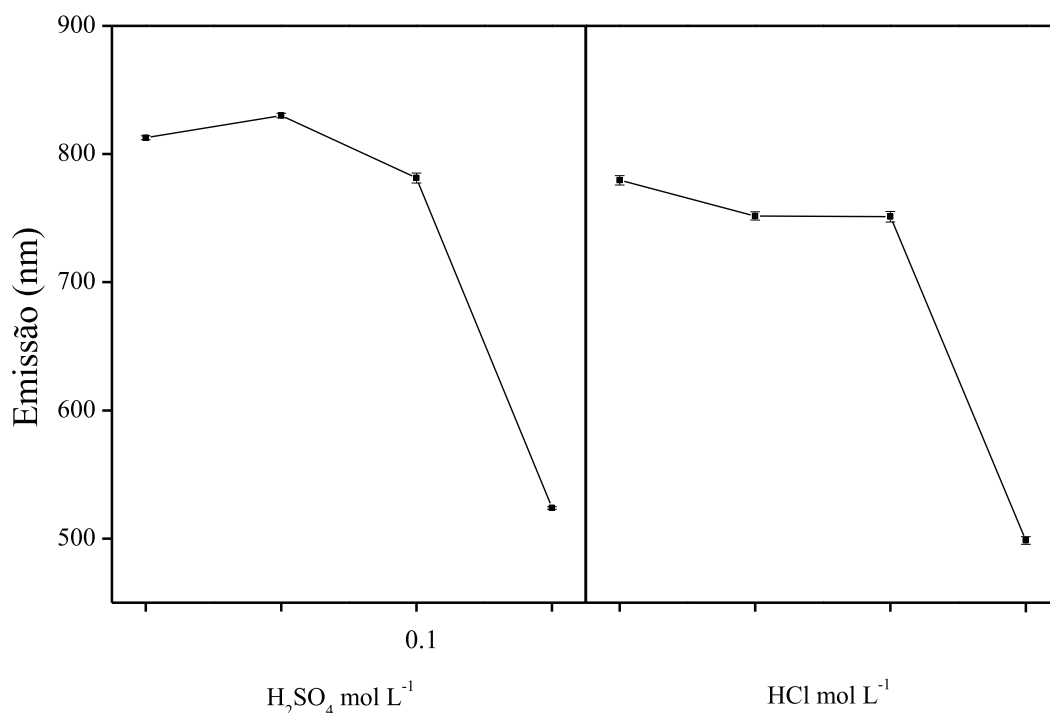


Figura 6. Efeito da concentração dos ácidos (H₂SO₄ e HCl) sobre intensidade de emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. (n=3)

O cetoconazol é uma base fraca e apresenta dois valores de pK_a. A estrutura química do cetoconazol (Figura 7) apresenta quatro nitrogênios na estrutura, sendo que somente dois apresentam caráter ácido-base. Os nitrogênios “B” e “D” são neutros, pois os pares de elétrons contribuem para a aromaticidade do anel imidazólico e ressonância como grupo carbonila adjacente, respectivamente. Provavelmente o nitrogênio “A” do anel imidazólico seja o nitrogênio mais básico da molécula, apresentando o maior valor de pK_a (6,5). O nitrogênio “C”, conjugado com o anel aromático, apresenta o valor de pK_a menor (2,9), pois o par de elétrons está em ressonância, levando a uma diminuição da sua disponibilidade para protonação (FOYE et al, 2002).

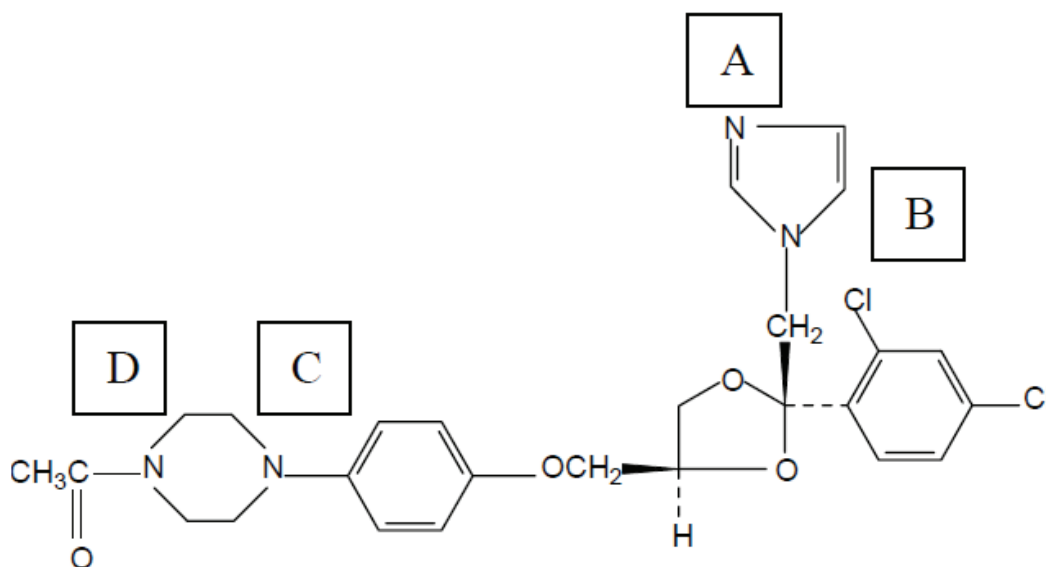


Figura 7. Estrutura química do Cetoconazol. As letras (A-D) indicam os diferentes grupos funcionais.

Verifica-se que a concentração da espécie (BH_2^{2+}) atinge seu ponto máximo em meio ácido, com o aumento do pH se verifica a diminuição da concentração desta espécie e o aumento da concentração da espécie (BH^+), que atinge a concentração máxima em cerca de pH 5. A presença da espécie totalmente desprotonada (B) é verificada em aproximadamente pH 8. Observa-se em relação ao diagrama de distribuição das espécies de equilíbrio do cetoconazol (Figura 8) em função do pH (MIRJANA et al, 2005).

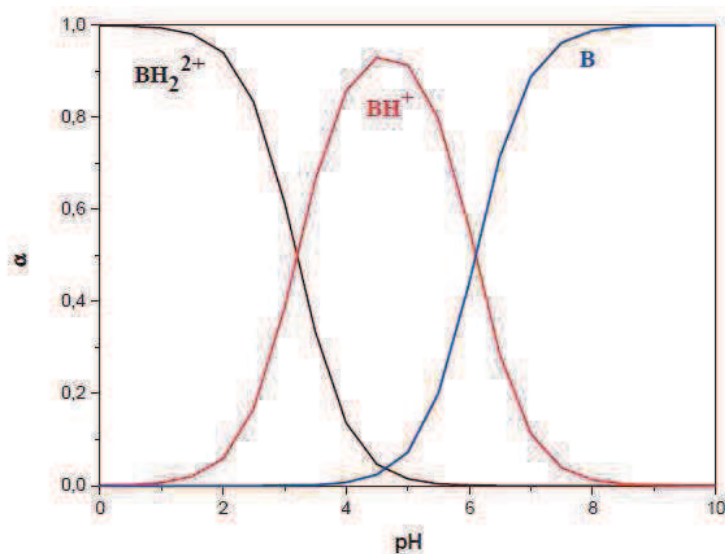


Figura 8. Distribuição das espécies de cetoconazol em solução aquosa em função do pH.

6. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de cetoconazol

6.1. Curva analítica do procedimento

Após a otimização da concentração do meio, determinação do λ de excitação e emissão, foi realizada a construção da curva analítica (Figura 9). A intensidade de emissão de fluorescência de uma solução padrão de cetoconazol monitorada em 380 nm ($\lambda_{\text{excitação}} = 265$ nm) apresentou relação linear com a concentração de cetoconazol na faixa entre $9,50 \times 10^{-6}$ a $7,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, obtendo-se a partir desta a seguinte equação de regressão linear $I = 3,09 \times 10^6 (\pm 4,0 \times 10^4) \times C_{\text{CTZ}} + 13,56 (\pm 2,9)$; onde I é a intensidade de emissão (u.a) e C_{CTZ} a concentração de Cetoconazol em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de regressão linear de 0,9995.

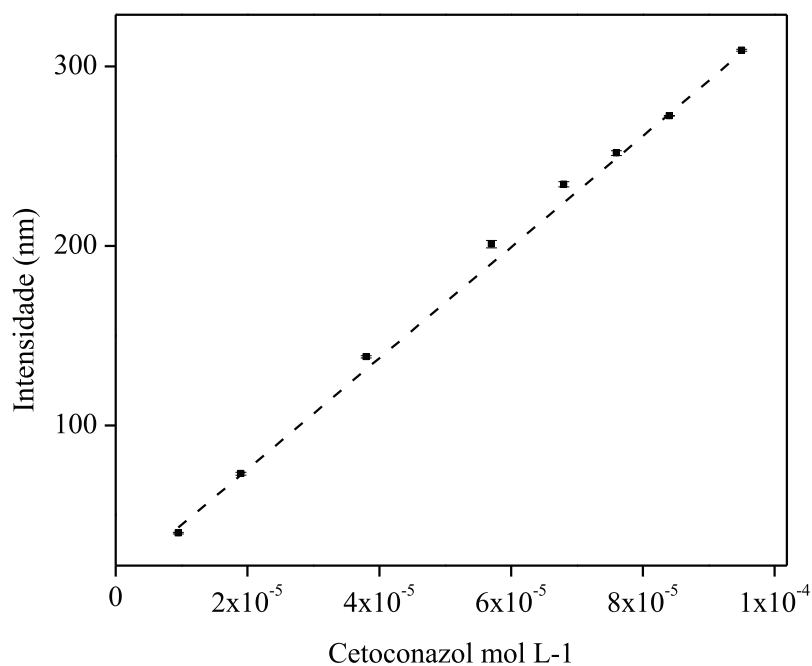


Figura 9. Curva analítica para determinação de cetoconazol empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico concentração de 0,01 mol L⁻¹ (n = 3). $\lambda_{\text{excitação}} = 265$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 380$ nm.

6.2. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento direto de cetoconazol

Após a obtenção da equação de regressão, avaliou-se o gráfico de resíduos em função da concentração de cetoconazol para verificar a significância da regressão (SILVA & COLLINS, 2011).

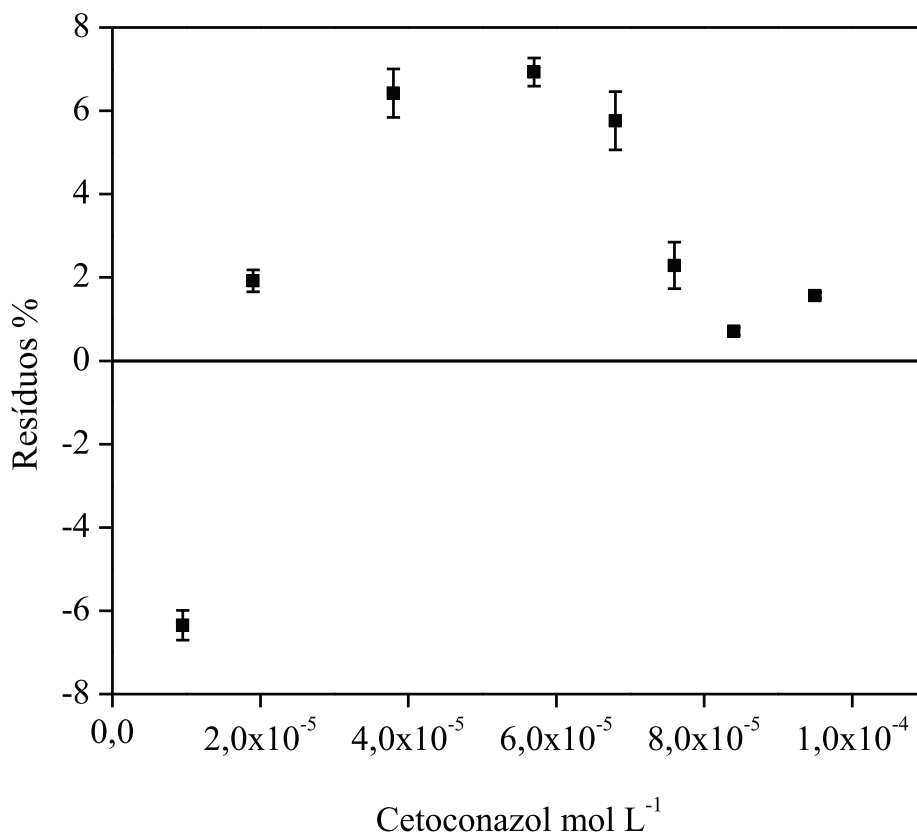


Figura 10. Gráfico dos resíduos em função da concentração de cetoconazol obtidos da curva analítica para determinação de cetoconazol pelo procedimento direto em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹.

Realizou-se a análise de variância dos dados da curva analítica para determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto. A ANOVA (Tabela 3) permite avaliar a significância da equação de regressão, verificando-se que o valor de $F(5.909,68)$ indica uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de cetoconazol estatisticamente significativa, onde o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o recomendado $F_{\text{crítico}}(p=0,05)= 5,987$ (TRIOLA, 2005).

Tabela 3. Análise de variância da curva analítica para determinação de cetoconazol

	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Significância F
Regressão	1	$2,63 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$	5.909	$3,26 \times 10^{-10}$
Resíduo	6	267,99	44,66		
Total	7	$2,64 \times 10^5$			

Um limite de detecção de $7,03 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um limite de quantificação de $1,24 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram obtidos para a curva de cetoconazol para o procedimento direto empregando ácido sulfúrico 0.01 mol L⁻¹.

Tabela 4. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Cetoconazol

Limite de Detecção (3×s)	$7,03 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ou $3,73 \times 10^{-7}$ mg L ⁻¹
Limite de Quantificação (10×s)	$1,24 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹
Faixa Linear	$9,5 \times 10^{-6}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹

s= desvio padrão da regressão da curva analítica.

Foram obtidas curvas analíticas para a determinação de cetoconazol e as sensibilidades e os coeficientes de correlação foram comparados (Tabela 5). As inclinações das curvas analíticas demonstram sensibilidade adequada e um coeficiente de variação de 6,9%. Os coeficientes lineares apresentaram um coeficiente de variação de 1,8%. Estes resultados indicam a reprodutibilidade do procedimento nas condições avaliadas.

Tabela 5. Equações das curvas analíticas e LD e LQ do procedimento proposto para a determinação de cetoconazol

	Equação da curva analítica	LD	LQ	r
		mol/L		
1	$I = 3,09 \times 10^6 (\pm 1,48 \times 10^5) \times C_{CTZ} + 13,6 (\pm 10,8)$	$2,82 \times 10^{-6}$	$9,39 \times 10^{-6}$	0,999
2	$I = 3,59 \times 10^6 (\pm 1,63 \times 10^5) \times C_{CTZ} + 13,2 (\pm 7,5)$	$1,59 \times 10^{-6}$	$5,29 \times 10^{-6}$	0,999
3	$I = 3,13 \times 10^6 (\pm 1,37 \times 10^5) \times C_{CTZ} + 12,9 (\pm 10,0)$	$2,59 \times 10^{-6}$	$8,63 \times 10^{-6}$	0,999

CCTZ = Concentração de cetoconazol em mol L⁻¹; r=coeficiente de regressão; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação. IC = $s \times t_{\text{crítico}}$; G.L=6; p=0,01; t=3,71.

Verifica-se na Tabela 5 uma diferença significativa da sensibilidade da curva 2 comparada as outras duas a um nível de confiança de 99%. Com relação aos coeficientes lineares, não houve diferença entre os valores obtidos nas curvas analíticas. O aumento da sensibilidade ocasiona menores limites de detecção e quantificação.

6.3. Recuperação de cetoconazol em águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico direto

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada estudando a recuperação de cetoconazol em matrizes de águas. O teste de recuperação de cetoconazol foi realizado empregando as seguintes concentrações: $1,9 \times 10^{-5}$; $3,8 \times 10^{-5}$; $5,7 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em seguida foram adicionadas 10% das amostras da matriz de interesse e realizado o procedimento. Foram avaliadas duas amostras de águas: potável e superficial (Tabela 6 e Tabela 7), na qual foi empregado o teste de hipótese para avaliar a exatidão do procedimento, demonstrando a recuperação média na faixa estudada.

Tabela 6. Recuperação de cetoconazol em água potável empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹

Cetoconazol/ (mol/L)		Recuperação (%)	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
$1,9 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5} \pm 3,8 \times 10^{-7}$	93,0	0,093
$3,8 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5} \pm 3,9 \times 10^{-7}$	102	
$5,7 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-5} \pm 1,5 \times 10^{-7}$	103	
$7,5 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-5} \pm 3,6 \times 10^{-7}$	102	

média \pm desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 3,182 (95%)

Tabela 7. Recuperação de cetoconazol em água de superfície empregando o procedimento direto em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹

Cetoconazol/ (mol/L)		Recuperação (%)	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
$1,9 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5} \pm 4,1 \times 10^{-7}$	95,3	0,216
$3,8 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5} \pm 2,9 \times 10^{-7}$	103	
$5,7 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-5} \pm 8,3 \times 10^{-7}$	102	
$7,5 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-7}$	101	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 3,182 (95%)

Observou-se que os valores de recuperação para as águas foram entre 93,0 a 103%. Podemos verificar que não existe influência da matriz em relação aos resultados, já que estão dentro dos limites de 80 a 120% como descrito na literatura (GONZALEZ et al, 1999; ANVISA 2003).

O procedimento proposto para quantificação de cetoconazol em águas empregando espectrofluorimetria apresentou um intervalo de linearidade próximo ao da literatura (SERESHTI et al, 2014) (Tabela 8). Os valores determinados para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) demonstram-se satisfatórios aos descrito na literatura.

Comparando com os métodos oficiais, o procedimento proposto é simples, realizado em matrizes sem a necessidade de tratamento de amostras, possui boa sensibilidade e não necessita de equipamentos caros como os procedimentos oficiais.

Tabela 8. Comparação do método proposto para cetoconazol em relação a literatura.

Técnica	Amostra	Linearidade	LD	LQ	Recuperação	Referência
Proposto	Água	$6,6 \times 10^{-6}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	0,15 µg/mL ⁻¹	88,7 µg/mL ⁻¹	90,92 à 137,42%	
HPLC – UV	Água salina	$5,80 \times 10^{-12}$ a $5,80 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	0,0003 µg/mL ⁻¹	0,001 µg/mL ⁻¹	43,33 à 106,66 %	SERESHTI et al, 2014
HPLC - FL	Mel	$1,2 \times 10^{-11}$ a $5,8 \times 10^{-10}$ mol L ⁻¹	0,001 µg/g ⁻¹	0,002 µg/g ⁻¹	63,4 à 66,8%	MAUDENS et al, 2004
UV-Vis	Comprimidos	$1,2 \times 10^{-8}$ a $1,2 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	700 µg/mL ⁻¹	NI	101 à 102%	NI et al, 2006
HPLC	Urina Humana	$2,9 \times 10^{-10}$ a $1,5 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹	0,008 µg/g ⁻¹	0,025 µg/g ⁻¹	90,65 à 95,30%	KILINC et al, 2009
HPLC – FL	Mel	$5,8 \times 10^{-15}$ a $5,8 \times 10^{-13}$ mol L ⁻¹	0,0002 µg/g ⁻¹	NI	NI	MUHAMMAD SAJID et al, 2013

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência; **HPLC-FL** - Cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluriométrica; **NI** - não informado pelo autor do trabalho. **UV-Vis**- Absorção molecular; **LQ** - Limite de quantificação; **LD** - Limite de detecção.
Limite de detecção.

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CETOCONAZOL EMPREGANDO CÉRIO(VI) COMO AGENTE OXIDANTE

7. Caracterização espectroscópica do Cetoconazol utilizando a matriz de excitação-emissão. Procedimento oxidativo.

O monitoramento do Cério(IV), como agente de oxidante, é empregado na intensidade de fluorescência para determinação de fármacos em matrizes ambientais. A definição do comprimento de onda a ser utilizado para a excitação da solução de cetoconazol e Cério(IV) foi realizada empregando-se da técnica de análise de matriz de excitação e emissão. Para construção dos diagramas de superfície (Figura 11) foi traçado o espectro de excitação por emissão variando-se o λ de 200 a 500 nm, para ambos, com um intervalo de 5 nm em relação ao monocromador.

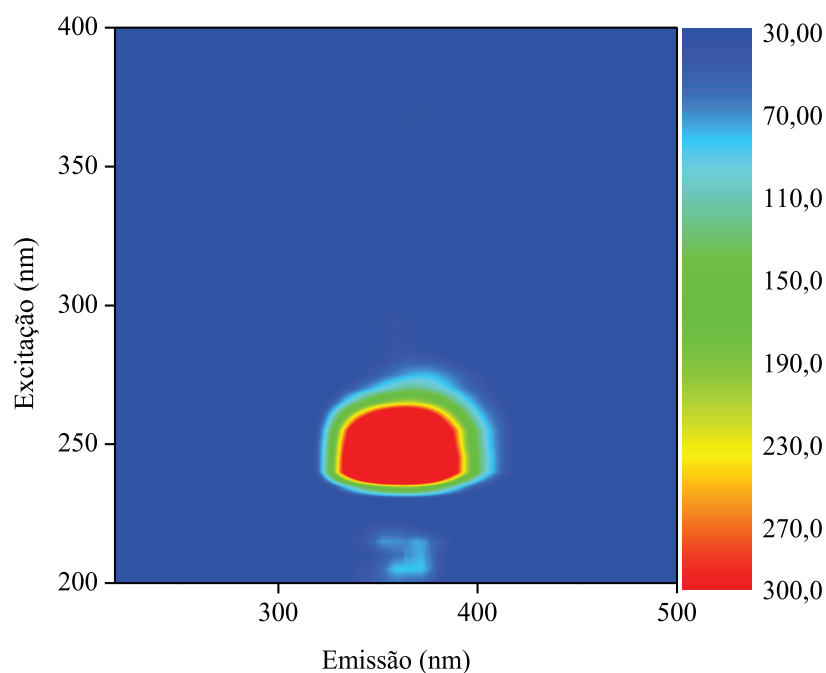


Figura 11. Matriz de excitação e emissão de cetoconazol $1,90 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em Cério(IV) $7,2 \times 10^{-4}$ em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹

Verificou-se que os espectros de fluorescência para a determinação do λ de excitação e emissão para o cetoconazol demonstraram sinais máximos nas seguintes regiões: $\lambda_{\text{excitação}} = 250 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 360 \text{ nm}$.

7.1. Espectros de excitação e emissão de cetoconazol em Cério(IV)

Obteve-se o espectro de emissão e excitação a partir de uma solução padrão do Cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ e Cério(IV) $7,2 \times 10^{-4}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 12). O Cério(IV) demonstra fluorescência nativa com λ máximo de excitação e emissão em $\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$, respectivamente.

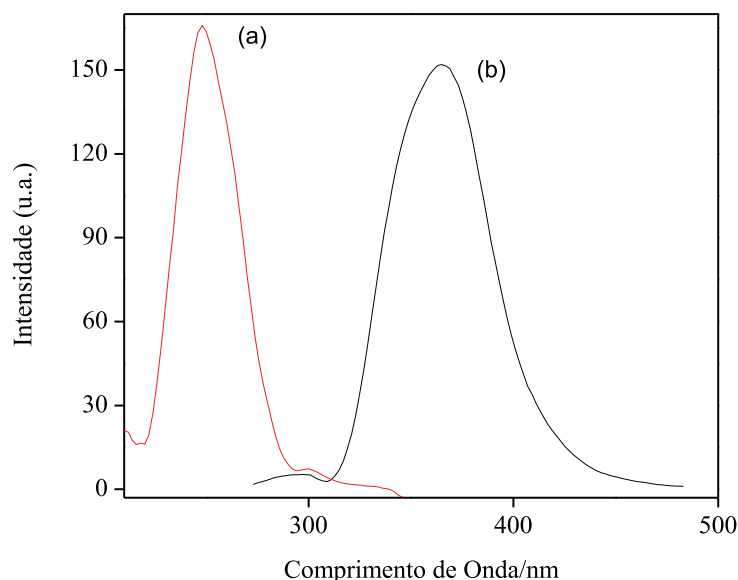


Figura 12. Espectro de (a) excitação e (b) emissão de cetoconazol $1,9 \times 10^{-4}$ em Cério(IV) $7,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

O Cério(IV) tem sido utilizado como agente oxidante para a determinação de compostos com atividades farmacêuticas (KHASHABA, 2002), visando o monitoramento da fluorescência de Cério(III) produzido a partir de sua reação de oxidação com cetoconazol. Neste trabalho, a intensidade de emissão do Cério(III) em 360 nm , quando excitado em 250 nm , deverá ser proporcional a concentração de cetoconazol presente na solução.

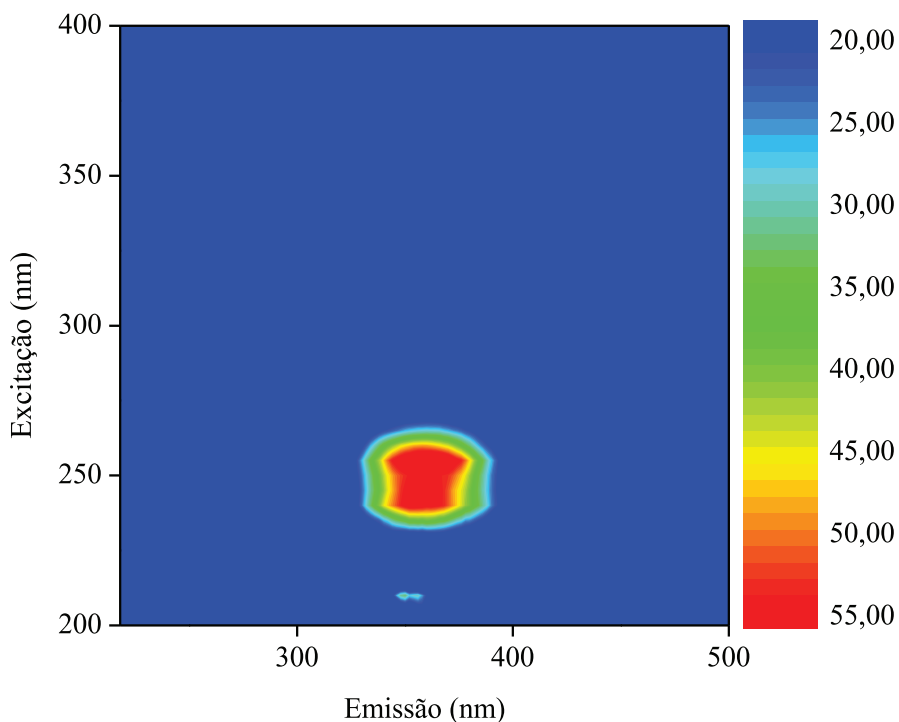


Figura 13. Matriz de excitação e emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-3}$ em ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A matriz de excitação e emissão foi obtida utilizando solução padrão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-3}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A matriz de excitação-emissão (Figura 13), foi traçado empregando os valores de intensidade obtidos dos espectros de emissão variando-se o λ de excitação entre 200 a 500 nm, com incrementos de 5 nm e emissão entre 200 a 400 nm com intervalos de 5 nm.

O espectro de fluorescência tridimensional (Figura 13) evidencia o comprimento de onda máximo de excitação e emissão em $\lambda_{\text{excitação}} = 250 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 360 \text{ nm}$ respectivamente, conforme verificado na literatura (DARWISH et al, 2005)

7.2. Caracterização espectroscópica da solução de Cério(IV)

Foram avaliados o efeito da concentração do ácido sulfúrico sobre os espectros de emissão e de excitação de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, verificou-se os comprimentos de onda de excitação e emissão máximo do analito (Figura

4).O Cério(IV) demonstra fluorescência nativa tendo seu λ máximo de excitação e emissão em 250 nm e 358 nm, respectivamente.

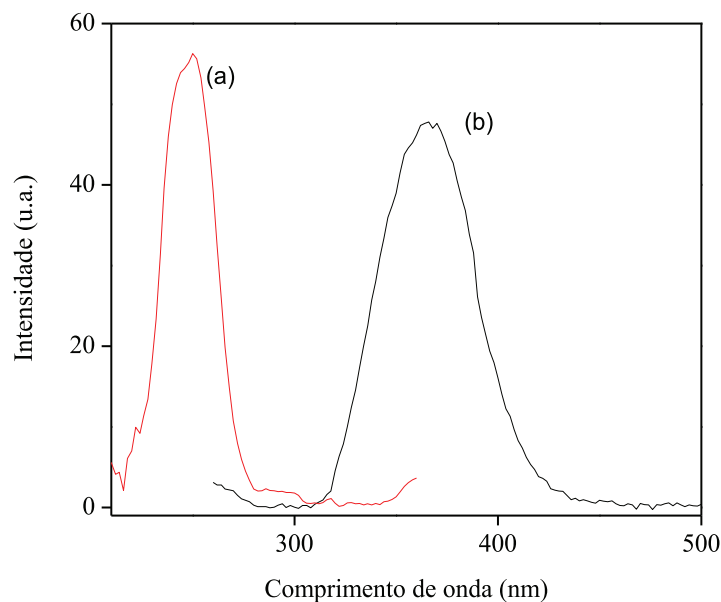


Figura 14. Espectro de excitação (a) e emissão de solução padrão de Cério(IV) ($1,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

7.3. Efeito da concentração de H_2SO_4 sobre a intensidade de emissão da solução padrão de Cério(IV)

Para avaliar a influência da concentração dos ácidos no meio reacional em relação a intensidade de emissão de Cério(IV) foi avaliado a seguinte faixa de concentração de $0,001$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico e clorídrico. Observou-se a ausência de deslocamentos no aumento do λ (batocrômico) ou diminuição do λ (hipsocrômico) no comprimento máximo de emissão, o mesmo permanecendo em λ 357 nm.

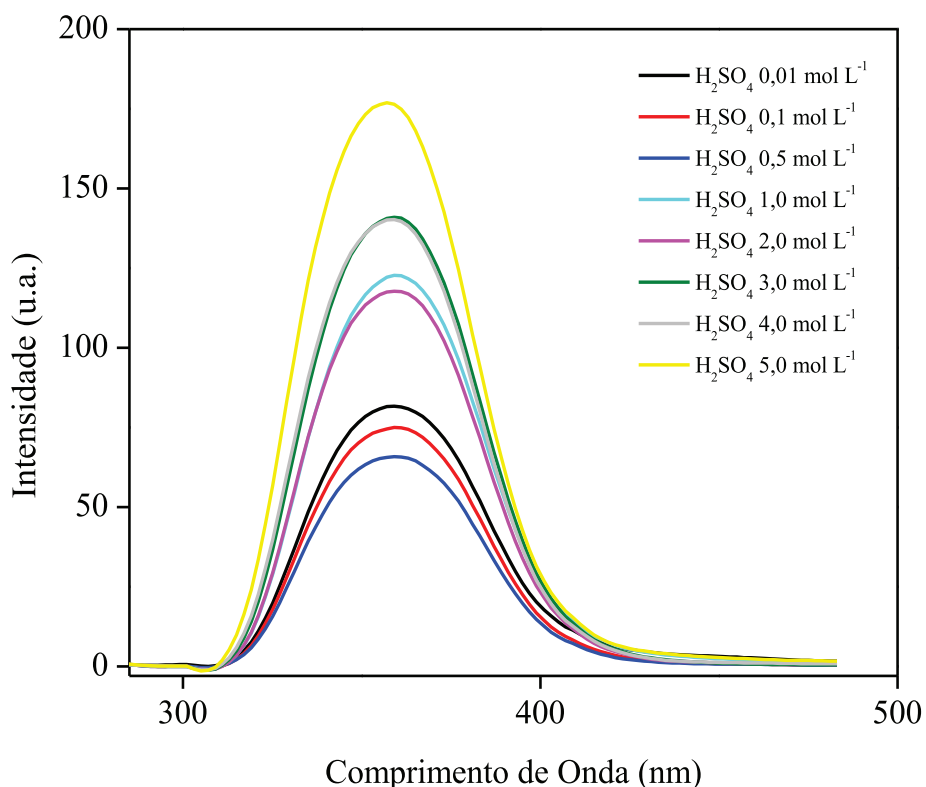


Figura 15. Influência da concentração sobre intensidade de emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-4}$ mol/L ($n=3$), $\lambda_{\text{excitação}} = 259$ nm.

Avaliou-se em relação a intensidade de emissão do Cério(IV) (Figura 6) que houve supressão nas concentrações de 0,01 a 0,5 mol L⁻¹ tornando-se crescente para as concentrações de 1,0 a 5,0 mol L⁻¹. Os resultados demonstraram a ausência de diferença significativa entre as concentrações de 1 a 5 mol L⁻¹, de tal forma que se utilizou a concentração de 1,0 mol L⁻¹ para a realização do trabalho, visando menor consumo de solventes com potencial agressivo ao meio ambiente e reduzindo seus descartes.

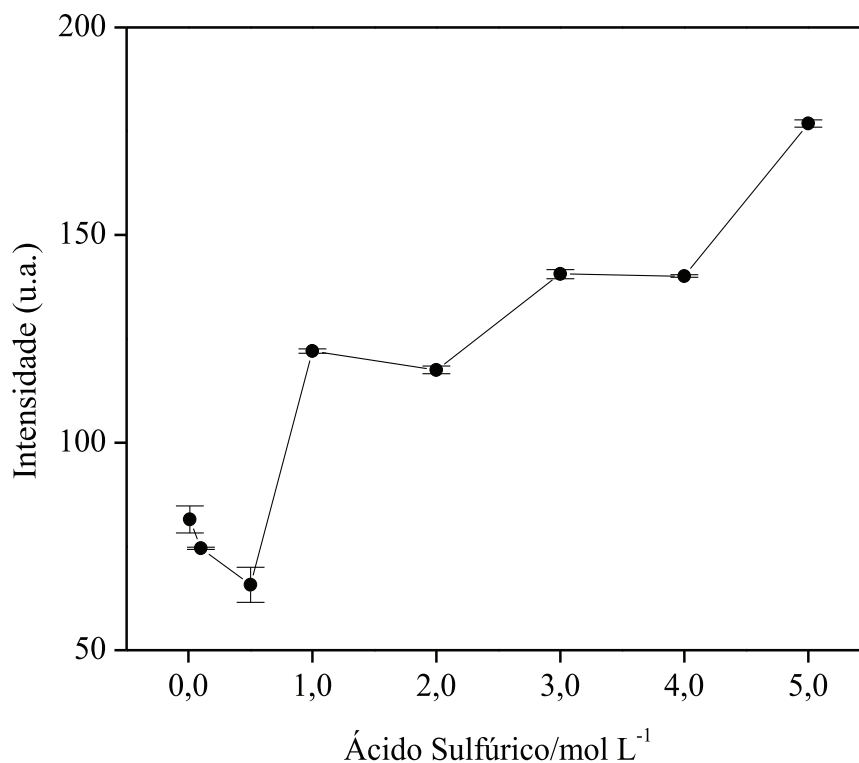


Figura 16. Efeito da concentração do ácido sulfúrico sobre intensidade de emissão de Cério(IV) $1,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n=3).

7.4. Parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação de cetoconazol empregando o procedimento oxidativo

Após otimização das condições experimentais, obteve-se a curva analítica para a determinação de cetoconazol empregando o procedimento proposto oxidativo. A curva apresentou uma linearidade entre a intensidade de emissão e a concentração de cetoconazol no intervalo de $3,80 \times 10^{-6}$ a $3,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A equação de regressão linear da curva analítica obtida pode ser descrita pela equação $I = 1,68 \times 10^7 \times C_{CTZ} + 54,39$; onde I é a intensidade de emissão (u.a.) monitorada em 360 nm ($\lambda_{excitação} = 250$ nm) e C_{CTZ} a concentração de cetoconazol em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de regressão linear de 0,9952 (HORWITZ, 2006).

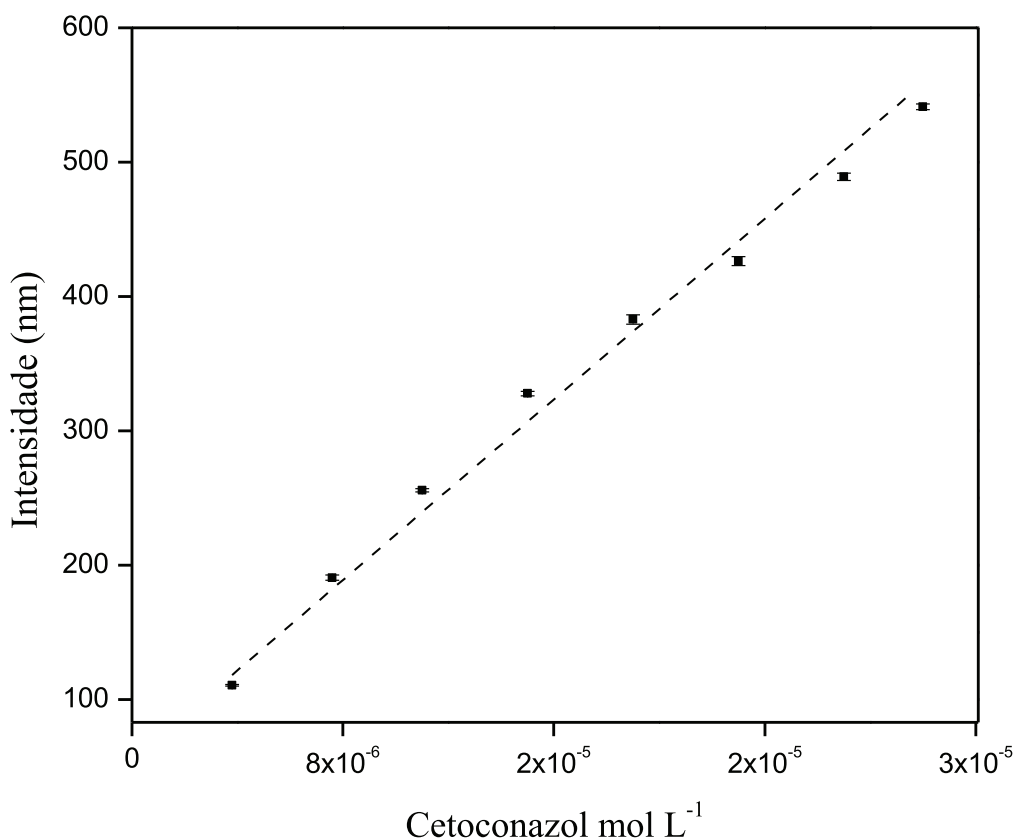


Figura 17. Curva analítica para determinação de cetoconazol empregando o procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹ (n = 3).

7.5. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento oxidativo de cetoconazol

Os resíduos obtidos da curva analítica foram avaliados estudando-se o gráfico dos resíduos em função da concentração de cetoconazol a partir dos dados da curva analítica para o procedimento oxidativo, como mostrado na Figura 18. Com os dados da curva analítica, calculou-se o desvio-padrão da regressão ($s_y=14,27$). Verificou-se a ausência de outliers devido ao fato de que os resíduos não forem superiores a duas vezes o desvio padrão da regressão ($2 \times s_y$) (HORWITZ, 2006).

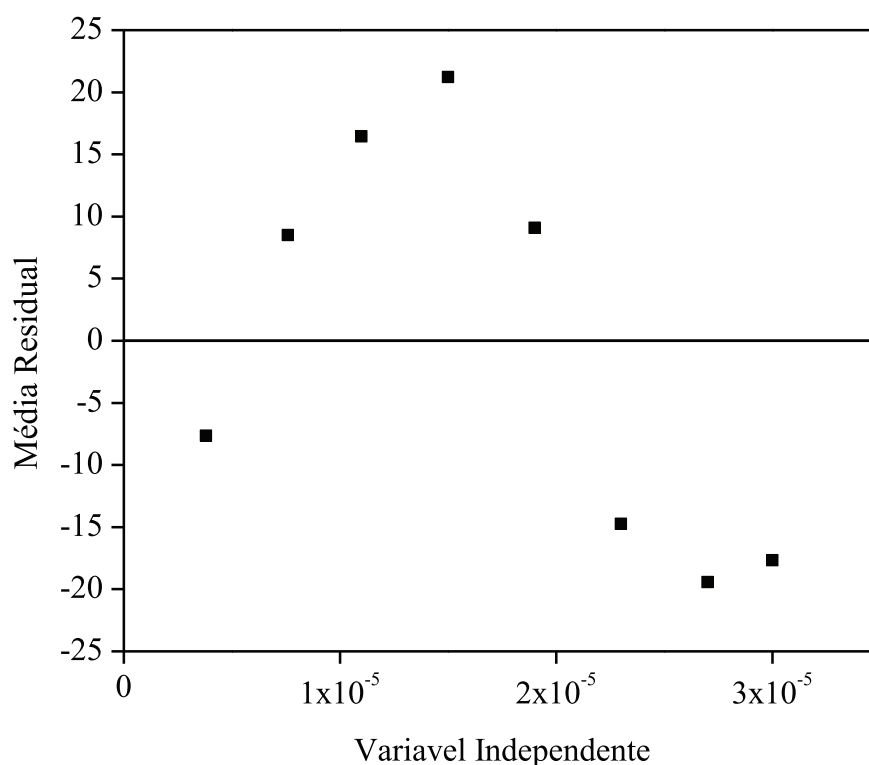


Figura 18. Gráfico dos resíduos em função da concentração de cetoconazol pelo procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹.

A significância estatística da equação de regressão linear da curva analítica foi avaliada ao nível de confiança 95%, conforme (Tabela 9). O resultado demonstra um valor de F (623,39) elevado o que indica a existência da relação linear entre intensidade de fluorescência e concentração do cetoconazol significativa, sendo o valor de $F_{\text{calculado}}$ muito acima do $F_{\text{crítico}}$ ($p=0,05$) = 5,987.

Tabela 9. Análise de variância da curva analítica para a determinação de cetoconazol empregando procedimento oxidativo

	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Significância F
Regressão	1	$6,32 \times 10^4$	$6,32 \times 10^4$	623,4	$2,71 \times 10^{-7}$
Resíduo	6	609,14	101,52		
Total	7	$6,38 \times 10^4$			

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $2,14 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $7,14 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Tabela 10. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de Cetoconazol empregando procedimento oxidativo

Limite de Detecção (3×s)	$2,14 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ou $3,96 \times 10^{-10}$ mg L ⁻¹
Limite de Quantificação (10×s)	$7,14 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹
Faixa Linear	$3,8 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹

s= desvio padrão da regressão da curva analítica.

A Tabela 11 apresenta as equações obtidas para as curvas analíticas do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de cetoconazol obtidas em dias diferentes. Verifica-se um coeficiente de variação na sensibilidade de 5,4%, enquanto o coeficiente de variação do coeficiente linear é de 34%.

Tabela 11. Equações das curvas analíticas para determinação de cetoconazol empregando procedimento oxidativo proposto

Equação da curva analítica	LD	LQ	r
	Cetoconazol/(mol/L)		
$I = 1,681 \times 10^7 (\pm 1,64 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 54,39 (\pm 20,8)$	$1,52 \times 10^{-6}$	$5,06 \times 10^{-4}$	0,995
$I = 1,652 \times 10^7 (\pm 2,25 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 132,27 (\pm 56,1)$	$4,16 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-3}$	0,991
$I = 1,485 \times 10^7 (\pm 2,18 \times 10^6) \times C_{CTZ} + 122,58 (\pm 51,0)$	$4,20 \times 10^{-6}$	$1,40 \times 10^{-3}$	0,992

C_{CTZ} = Concentração de Cetoconazol em mol L⁻¹; r = coeficiente de regressão;

IC = $\pm s \times t_{\text{crítico}}$; g.l.=6; p=0,05, t=2,45;

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação

7.6. Estudo da recuperação de cetoconazol em águas empregando o procedimento oxidativo proposto

No ensaio de recuperação (Rec.) do analito, foram empregadas três concentrações de cetoconazol ($7,6 \times 10^{-6}$; $2,3 \times 10^{-6}$ e $3,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) adicionadas as amostras de água potável, água de superfície e água de piscicultura e o cetoconazol foi determinado empregando o procedimento proposto, conforme Tabela 12 e Tabela 13

Tabela 12. Ensaios de recuperação para a determinação de Cetoconazol em água potável empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹

Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação (%)	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
7,6×10 ⁻⁶	8,3×10 ⁻⁵ ±1,2×10 ⁻⁷	109	0,45
2,3×10 ⁻⁵	2,4×10 ⁻⁵ ±9,6×10 ⁻⁸	105	
3,8×10 ⁻⁵	3,5×10 ⁻⁵ ±1,5×10 ⁻⁷	92,7	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 4,303 (95%)

Tabela 13. Recuperação de cetoconazol em água de superfície empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹

Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação (%)	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
7,6×10 ⁻⁶	9,7×10 ⁻⁶ ±8,8×10 ⁻⁸	128	0,93
2,3×10 ⁻⁵	2,4×10 ⁻⁵ ±2,8×10 ⁻⁸	104	
3,8×10 ⁻⁵	3,6×10 ⁻⁵ ±8,8×10 ⁻⁷	95,4	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 4,303 (95%)

Tabela 14. Recuperação de cetoconazol em água de piscicultura empregando procedimento oxidativo em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹.

Cetoconazol / mol L ⁻¹		Recuperação (%)	t _{calculado}
Adicionado	Encontrado		
7,6×10 ⁻⁶	8,3×10 ⁻⁵ ±4,5×10 ⁻⁸	109	0,69
2,3×10 ⁻⁵	2,5×10 ⁻⁵ ±7,7×10 ⁻⁸	108	
3,8×10 ⁻⁵	3,6×10 ⁻⁵ ±2,4×10 ⁻⁷	93,5	

média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 4,303 (95%)

Os valores de recuperação para as amostras de águas variaram de 93,7 a 128%. Observou-se que não existe influência da matriz de amostra em relação aos resultados, pois não houve interferência em relação aos valores da faixa de recuperação os quais deve ser 80 a 120% (ANVISA 2003), os ensaios de recuperação das amostras de água indicam exatidão adequada para determinação do cetoconazol empregando o procedimento proposto.

Tabela 15. Comparação dos parâmetros de confiabilidade analítica entre os procedimentos para determinação de cetoconazol (procedimento direto e oxidativo)

Parâmetros	Oxidativo	Direto
LQ/ mol L ⁻¹	$7,14 \times 10^{-7}$	$1,24 \times 10^{-6}$
LD/ mol L ⁻¹	$2,14 \times 10^{-7}$	$7,03 \times 10^{-7}$
Faixa linear/ mol L ⁻¹	$3,80 \times 10^{-6}$ a $3,00 \times 10^{-5}$	$9,50 \times 10^{-6}$ a $7,90 \times 10^{-5}$
Equação	$I = 1,68 \times 10^7 \times C_{CTZ} + 54,39$	$I = 3,09 \times 10^6 \times C_{CTZ} + 13,56$
Recuperação/%	92,7 a 128	93,0 a 103

LQ: Limite de quantificação; LD: Limite de detecção; I: intensidade de emissão; C: concentração do analito

PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE SULFANILAMIDA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

8. Definição do comprimento de onda de excitação utilizando matriz de excitação e emissão (MEE) para a sulfanilamida

A partir de uma solução padrão de sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ obteve-se os comprimentos de onda de excitação e emissão empregando a técnica de fluorescência. Os espectros de fluorescência (Figura 19) demonstraram λ de excitação e emissão em $\lambda_{ex} = 245$ e $\lambda_{em} = 345$ nm, respectivamente, assim como relatado na literatura (GIL et al, 2005). O espectro de emissão e excitação foram determinados variando-se o λ de 200 a 500 nm, para ambos, com incrementos de 5 nm em relação a varredura do monocromador.

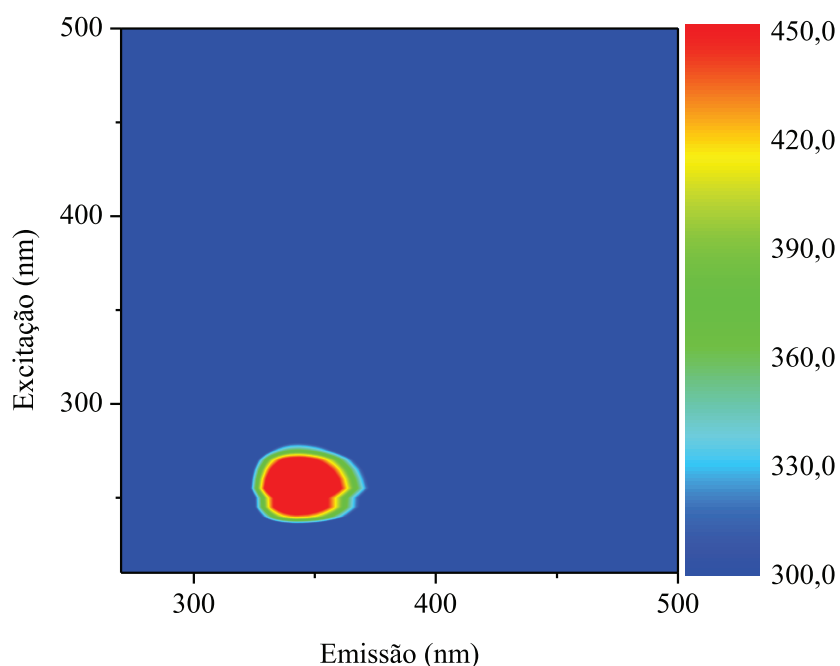


Figura 19. Matriz de excitação e emissão de sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

8.1. Espectros de excitação e emissão de sulfanilamida

Obteve-se o espectro de excitação e emissão da sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 20). Pode-se verificar que existe fluorescência nativa com seu máximo de excitação em 255 nm e máximo de emissão em 345 nm.

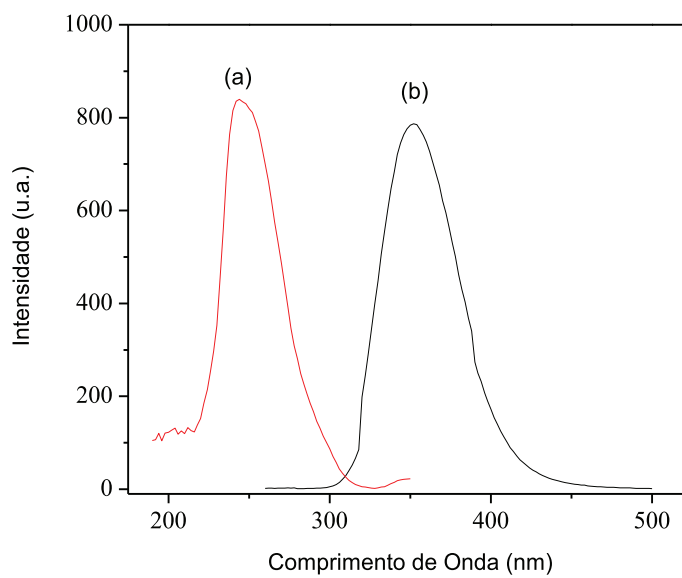


Figura 20. Espectro de excitação (a) e emissão (b) de solução padrão de sulfanilamida $5,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

8.2. Efeito da concentração sobre a intensidade do sinal de emissão da sulfanilamida empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto

O efeito da concentração do meio reacional na solução afeta consideravelmente os processos de absorção e emissão dos fluoróforos. Neste sentido, verificou-se a influência da concentração de ácido e base em relação ao sinal analítico, de forma que variasse a concentração de $0,001$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético, ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Observa-se (Figura 6) que os sinais da sulfanilamida não sofreram deslocamentos em seus comprimentos de onda, aumento (batocrômico) ou diminuição (hipsocrômico) nos espectros de emissão, podendo assim alterar o valor máximo da intensidade.

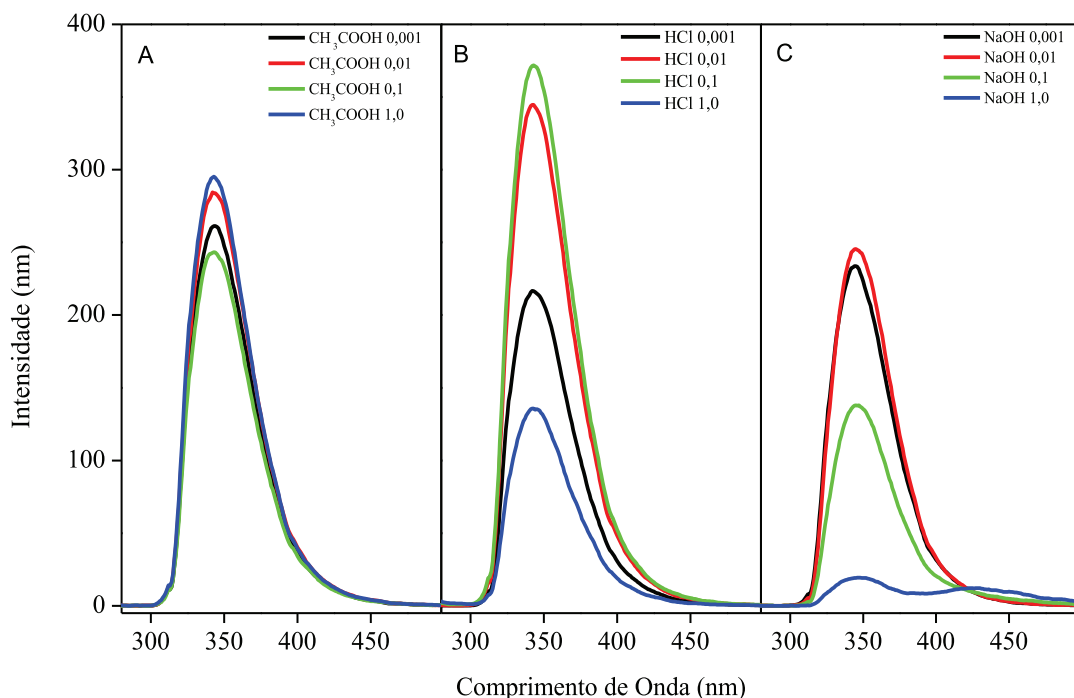


Figura 21. Espectros de emissão de solução padrão de sulfanilamida $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ obtidos em diferentes concentrações ($n=3$). λ excitação = 245 nm.

Verificou-se maior do sinal de intensidade de emissão para as concentrações de 0,1 e 1,0 mol L⁻¹ para o ácido acético e 0,01 e 0,1 mol L⁻¹ do ácido clorídrico e. No caso da solução de hidróxido de sódio, observou-se um aumento da supressão em relação ao sinal de intensidade de emissão com o aumento da concentração do NaOH. Pode se observar que conforme o aumento gradativo da concentração consequentemente sua desprotonação, a solução de sulfanilamida perde sua capacidade de fluorescência podendo ser causado presença em maior concentração dos íons OH⁻ os quais podem estar suprimindo a fluorescência por efeito de filtro interno, assim como, sua espécie protonada não tenha propriedades fluorescentes.

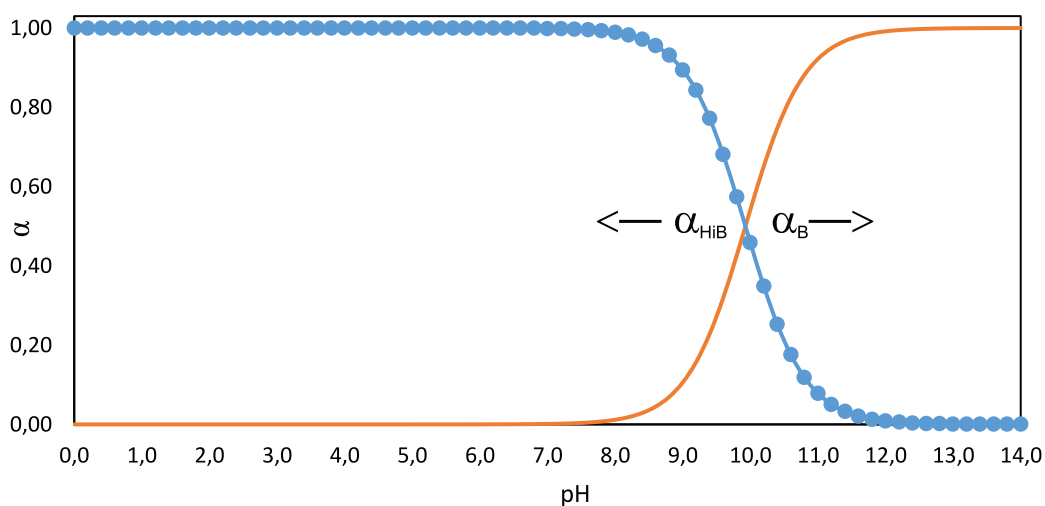


Figura 22. Gráfico de distribuição das espécies de Sulfanilamida (pKa 10,6).

Relacionando-se a intensidade do sinal analítico com as concentrações dos meios reacionais, verificou-se o aumento do sinal em relação a concentração de H^+ . O ácido clorídrico na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou maior intensidade em relação ácido acético e o hidróxido de sódio, obtendo 20,5% e 33,7% respectivamente.

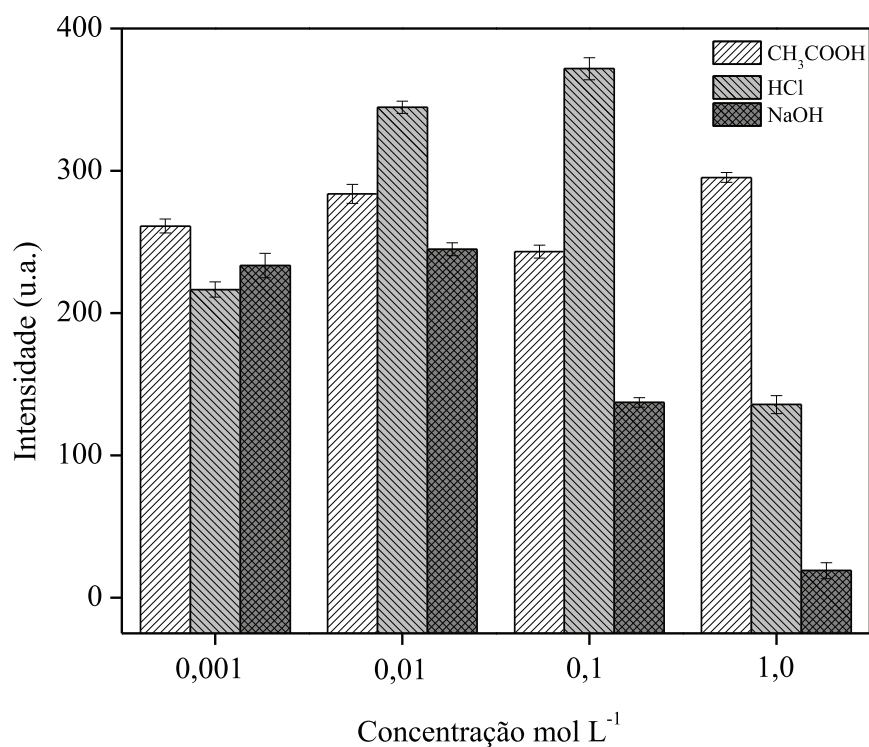


Figura 23. Efeito da concentração sobre intensidade de emissão de solução padrão de sulfanilamida $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3).

8.3. Parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico

Após a otimização dos parâmetros químicos como influência da concentração do meio reacional, sobre intensidade do analito e λ de excitação máximo definidos. Utilizou-se dos valores de intensidade de emissão de diferentes concentrações de sulfanilamida, construiu-se a curva analítica que é apresentada na Figura 8, cada ponto representa a média de três medidas experimentais ($n = 3$).

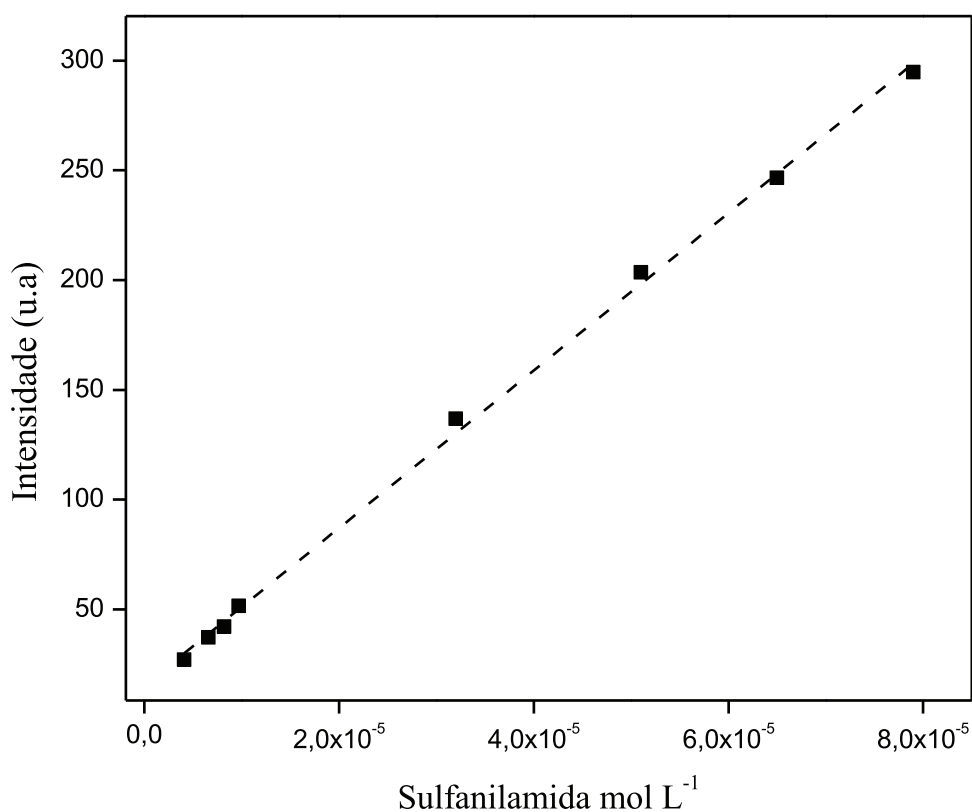


Figura 24. Curva analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento proposto em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. ($n = 3$)

Observou-se que a curva analítica apresenta relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração de sulfanilamida no intervalo de $6,60 \times 10^{-6}$ a $7,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. É possível descrever a equação de regressão: $I = 2,68 \times 10^6 (\pm 4,6 \times 10^4) \times C_{SAM} + 4,14 (\pm 2,7)$; onde I é a intensidade de emissão (u.a) e C_{SAM} a concentração de Sulfanilamida em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de regressão linear de 0,9991.

8.4. Análise dos resíduos da curva analítica para o procedimento de sulfanilamida

O gráfico de resíduos em função da concentração (Figura 9) foi obtido a partir da regressão obtida na curva analítica. A avaliação dos resíduos em função da concentração permite detectar problemas no ajuste da curva como: desvios da linearidade e *outlier*. Para ser considerada uma curva com bom ajuste a mesma deve demonstrar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (SILVA et al, 2011).

Observou-se que houve um desvio máximo de 10% no gráfico dos resíduos referente a menor concentração da faixa linear e 5% para a concentração intermediária da curva analítica, o que demonstrou que não existem desvios de linearidade para a curva analítica de sulfanilamida proposta.

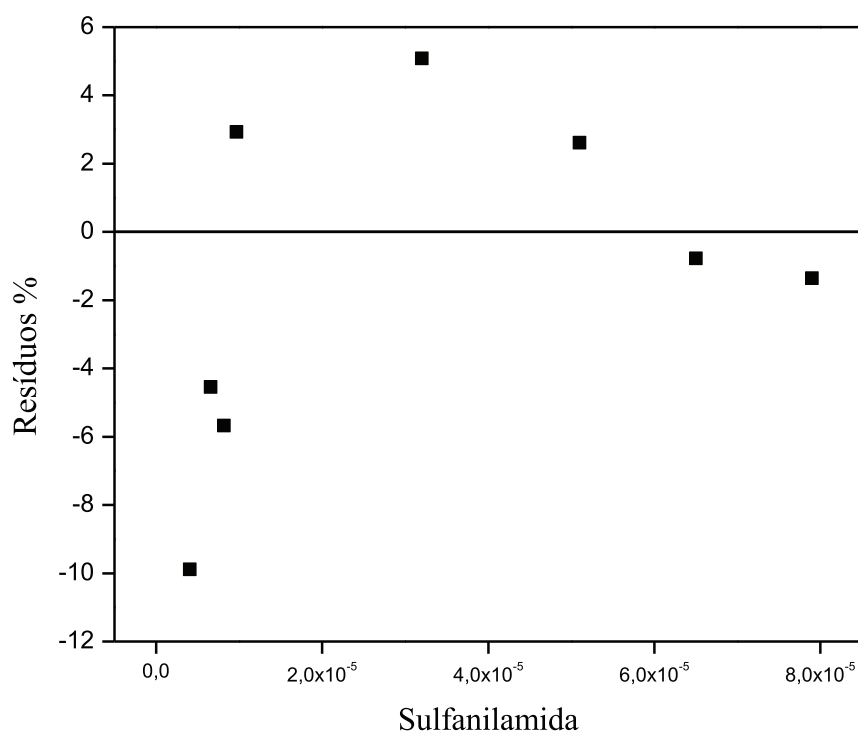


Figura 25 Gráfico dos resíduos em função da concentração de sulfanilamida em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

8.5. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto

Avaliou-se significância estatística da equação de regressão obtida na curva analítica obtendo-se a ANOVA, para avaliar a existência da relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração da sulfanilamida. Na ANOVA apresentada na Tabela 16, verifica-se um valor de F de 4.264,30. Comparando o valor obtido com o valor crítico de F ao nível de confiança de 95% é de 5,987, verifica-se a existência da relação de linearidade entre a intensidade da fluorescência estatisticamente significativa (TRIOLA, 2005).

Tabela 16. Análise de variância da curva analítica para determinação de sulfanilamida empregando o procedimento espectrofluorimétrico

	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Significância F
Regressão	1	$7,91 \times 10^4$	$7,91 \times 10^4$	4.264	$8,67 \times 10^{-10}$
Resíduo	6	111,31	18,55		
Total	7	$7,92 \times 10^4$			

O limite de detecção e quantificação calculados foram de $8,90 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $5,15 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente e são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação de sulfanilamida

Limite de Detecção (3×s)	$8,90 \times 10^{-10}$ mol L ⁻¹ ou $1,54 \times 10^{-7}$ mg L ⁻¹	$3,0 \times 10^{-6}$
Limite de Quantificação (10×s)	$5,15 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$1,0 \times 10^{-5}$
Faixa Linear	$6,6 \times 10^{-6}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	

s= desvio padrão da regressão da curva analítica.

Para avaliação da robustez do procedimento, obteve-se as equações das curvas analíticas e os coeficientes de correlação. Respeitando-se um intervalo de 24 horas de sete a trinta dias entre as análises para construção das curvas analíticas, com o objetivo de avaliar as inclinações das regressões lineares entre os dias.

As inclinações avaliadas demonstraram alta sensibilidade do procedimento desenvolvido. Observou-se que os valores para os coeficientes de variação das inclinações foram menores que 10% (n=3). Verifica-se um coeficiente de regressão adequada dentro da faixa de dos coeficientes de regressão os quais devem ser maiores que 0,99 (ANVISA 2003). O limite de detecção encontrado foi de $2,65 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Tabela 18. Equações das curvas analíticas para determinação de sulfanilamida empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto.

Equação da curva analítica	Limite de detecção/ mol/L	r
$I = 4,48 \times 10^6 (\pm 2,86 \times 10^5) \times C_{SAM} + 10,0 (\pm 13,6)$	$3,71 \times 10^{-6}$	0,998
$I = 4,16 \times 10^6 (\pm 1,34 \times 10^5) \times C_{SAM} + 7,50 (\pm 5,9)$	$3,31 \times 10^{-6}$	0,999
$I = 3,71 \times 10^6 (\pm 3,64 \times 10^5) \times C_{SAM} + 9,60 (\pm 15,2)$	$1,15 \times 10^{-6}$	0,997
$I = 3,64 \times 10^6 (\pm 3,71 \times 10^5) \times C_{SAM} + 10,1 (\pm 16,7)$	$2,41 \times 10^{-6}$	0,996

C_{SAM} = Concentração de Sulfanilamida em mol L⁻¹; r=coeficiente de regressão;

IC= $\pm s \times t_{\text{crítico}}$; g.l.=6; p=0,01, t=3,71;

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

8.6. Estudo da recuperação de sulfanilamida em amostras de água

O procedimento para o teste de recuperação, procedeu-se com as seguintes concentrações: $6,6 \times 10^{-6}$; $7,5 \times 10^{-6}$; $8,3 \times 10^{-6}$ e $9,30 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de sulfanilamida, as quais foram adicionadas a 10% das amostras das matrizes ambientais: águas de potável e subterrânea, as amostras não passaram por nenhum processo de tratamento além da filtração para retirada de material particulado.

Tabela 19. Ensaio de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água de subterrânea, ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação / %	t _{calculado}
Sulfanilamida / mol L⁻¹			
6,6×10 ⁻⁶	8,32×10 ⁻⁶ (±1,9×10 ⁻⁷)	126	10,29
7,5×10 ⁻⁶	1,03×10 ⁻⁵ (±3,6×10 ⁻⁸)	137	
8,3×10 ⁻⁶	1,12×10 ⁻⁵ (±1,6×10 ⁻⁷)	134	
9,3×10 ⁻⁶	1,19×10 ⁻⁵ (±1,2×10 ⁻⁷)	128	

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

Tabela 20. Ensaio de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água potável, ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação (%)	t _{calculado}
Sulfanilamida / mol L⁻¹			
6,6×10 ⁻⁶	6,0×10 ⁻⁶ (±1,9×10 ⁻⁷)	91,2	-2,94
7,5×10 ⁻⁶	7,0×10 ⁻⁶ (±9,3×10 ⁻⁸)	94,3	
8,3×10 ⁻⁶	8,2×10 ⁻⁶ (±1,9×10 ⁻⁷)	98,5	
9,3×10 ⁻⁶	8,9×10 ⁻⁶ (±1,5×10 ⁻⁷)	95,5	

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

Tabela 21. Ensaio de recuperação para a determinação de sulfanilamida em água potável, ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação/%	t _{calculado}
Sulfanilamida / mol L⁻¹			
6,6×10 ⁻⁶	6,0×10 ⁻⁶ (±8,6×10 ⁻⁸)	90,9	-0,37736
7,5×10 ⁻⁶	7,2×10 ⁻⁶ (±7,4×10 ⁻⁸)	96,0	
8,3×10 ⁻⁶	8,4×10 ⁻⁶ (±7,6×10 ⁻⁸)	101	
9,3×10 ⁻⁶	9,9×10 ⁻⁶ (±1,0×10 ⁻⁷)	106	

^(a)média ± desvio padrão; n=3; t (tabelado)= 3,182 (95%)

Os valores obtidos para o teste de recuperação das águas variaram entre 128 a 137%. Verificou-se que pode haver influência da matriz da amostra sobre os resultados devido ao alto valor de 137% para a amostra de água subterrânea acima da faixa

estabelecida que deve ser entre 80 a 120% (ANVISA 2003). Com exceção da água subterrânea a qual demonstrou valores acima de 120% para a recuperação o que pode estar relacionado com a grande quantidade de metais presentes na água, como exemplo alumínio, o que pode ter causado a interferência nos resultados de fluorescência, os ensaios de recuperação indicam uma boa exatidão do método proposto

O método proposto empregando a espectrofluorimetria para quantificação de sulfanilamida em matrizes de águas, demonstrou um intervalo de linearidade maior que os descritos na literatura (FRAIHAT & BAHGAT, 2014) (Tabela 7). Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) demonstram ser melhores/menores que o descrito na literatura (CHITESCU et al, 2015) as quais empregam técnicas de elevado custo em relação ao método desenvolvido.

Tabela 22. Comparação do método proposto para sulfanilamida em relação a literatura.

Técnica	Amostra	Linearidade	LD	LQ	Recuperação	Referência
Proposto	Águas	$9,5 \times 10^{-6}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	114 µg/mL ⁻¹	379 µg/mL ⁻¹	93.03 a 103,71%	
UV-Vis	Fármacos	$9,4 \times 10^{-12}$ a $6,6 \times 10^{-11}$	2,3 µg/mL ⁻¹	6,9 µg/mL ⁻¹	97 a 98 %	FRAIHAT & BAHGAT, 2014
VC - VPD	Cosmético	$1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	56,0 µg/mL ⁻¹	187 µg/mL ⁻¹	99 a 100,2%	EL RIES et al, 2013
UV-Vis	Comprimidos	$4,1 \times 10^{-13}$ a $3,2 \times 10^{-12}$ mol L ⁻¹	0,13 µg/mL ⁻¹	0.17 µg/mL ⁻¹	97.77 a 99.89%	RANEA & PADMAJA, 2012
VC	Creme e Comprimidos	4.97×10^{-7} a 4.30×10^{-6} mol L ⁻¹	64 µg/mL ⁻¹	201,9 µg/mL ⁻¹	90.84 a 104,9 %	DANTAS et al, 2010
HPLC	Água	NI	0,00050 µg/mL ⁻¹	0,0010 µg/mL ⁻¹	88.1%	VAN DE STEENE & LAMBERT, 2010
U-HPLC	Água de superfície	0 a $9,4 \times 10^{-11}$ mol L ⁻¹	0,50 µg/mL ⁻¹	1,0 µg/mL ⁻¹	87%	CHITESCU et al, 2015

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência; **U-HPLC** -Ultra Cromatografia líquida de alta eficiência; **VC** -Voltametria cíclica; **VC-VPD** –Voltametria Cíclica - Voltametria por pulso diferencial; **UV-Vis** - Absorção molecular; **NI** - Não informado pelo autor; **LQ** - Limite de quantificação; **LD** - Limite de detecção.

PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ENROFLOXACINO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

9. Caracterização espectroscópica da solução do enrofloxacino

Para a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão foi obtido um espectro de fluorescência tridimensional de uma solução padrão de enrofloxacino $3,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido acético 1% v/v. Os espectros de fluorescência demonstram o comprimento de onda máximo de excitação em 370 nm e um comprimento de onda de máxima emissão em 448 nm.

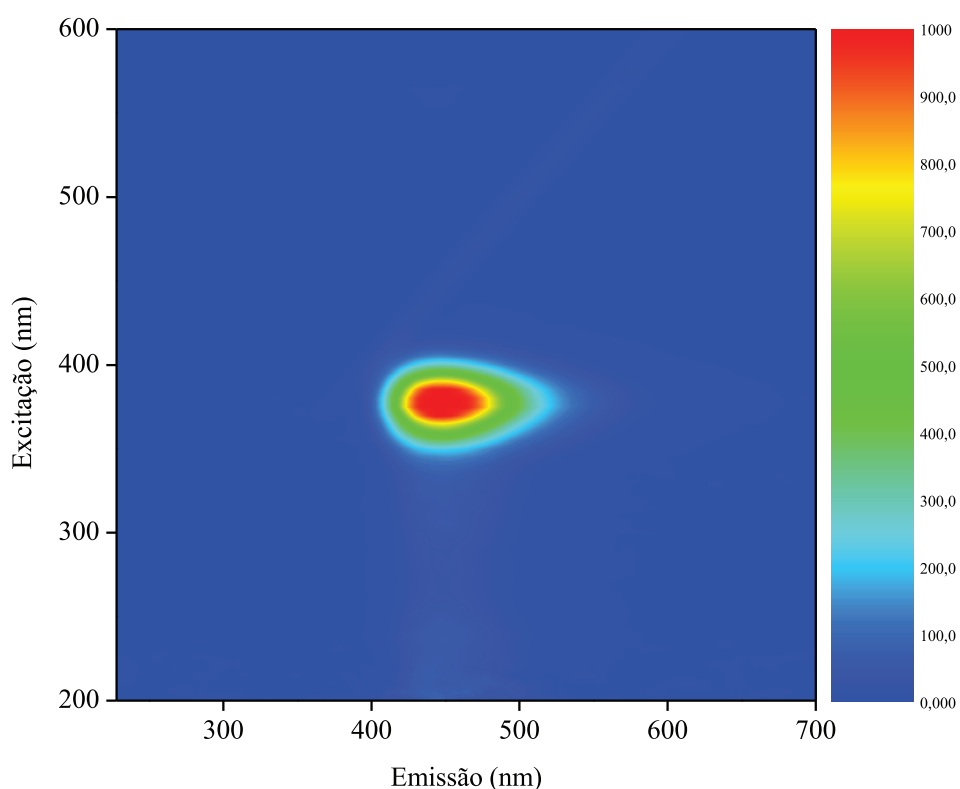


Figura 26. Matriz de excitação e emissão de solução padrão de enrofloxacino $3,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido acético 1% v/v.

9.1. Efeito da composição do meio sobre a emissão do enrofloxacino

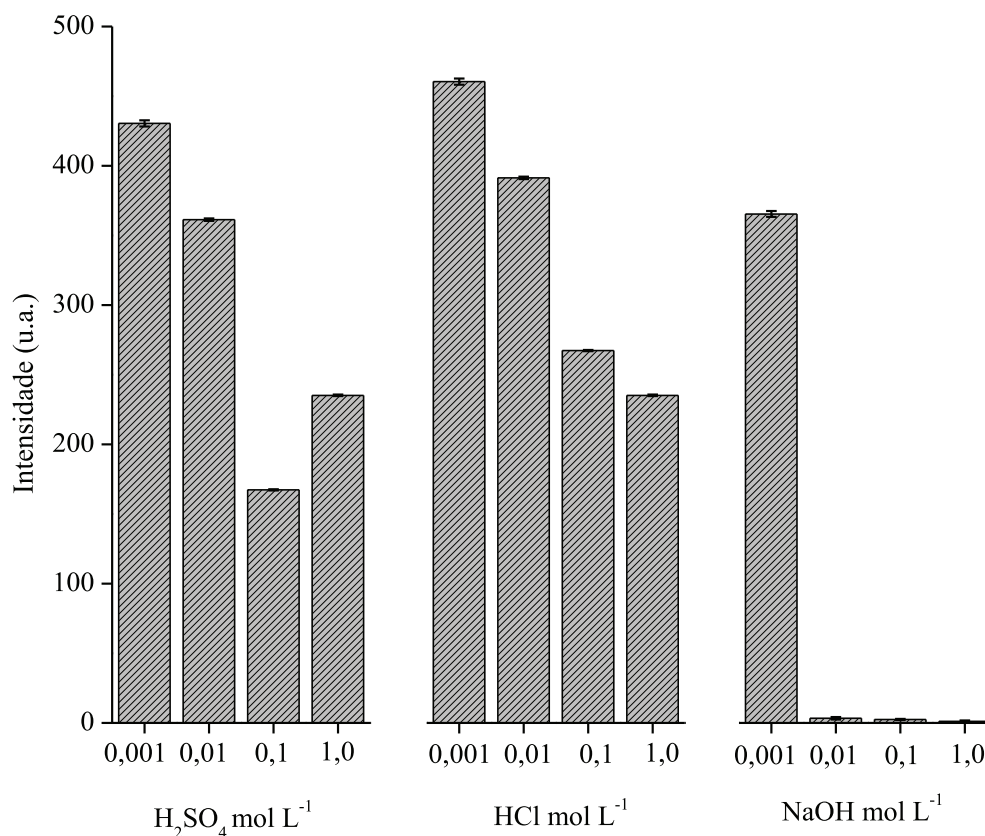


Figura 27. Efeito da concentração de H₂SO₄, HCl e NaOH na intensidade de emissão do Enrofloxacino

9.2. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação do enrofloxacino

Sob as condições otimizadas, obteve-se uma curva analítica que apresentou relação linear entre intensidade de emissão e a concentração de enrofloxacino no intervalo de $7,40 \times 10^{-7}$ a $7,39 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A equação de regressão linear da curva analítica obtida foi $I = 3,74 \times 10^6 (\pm 4,41 \times 10^{-4}) \times C_{\text{enro}} + 0,17 (\pm 0,16)$; onde I é a intensidade de emissão (u.a) em 448 nm e C_{enro} a concentração de enrofloxacino em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de regressão linear de 0,9998.

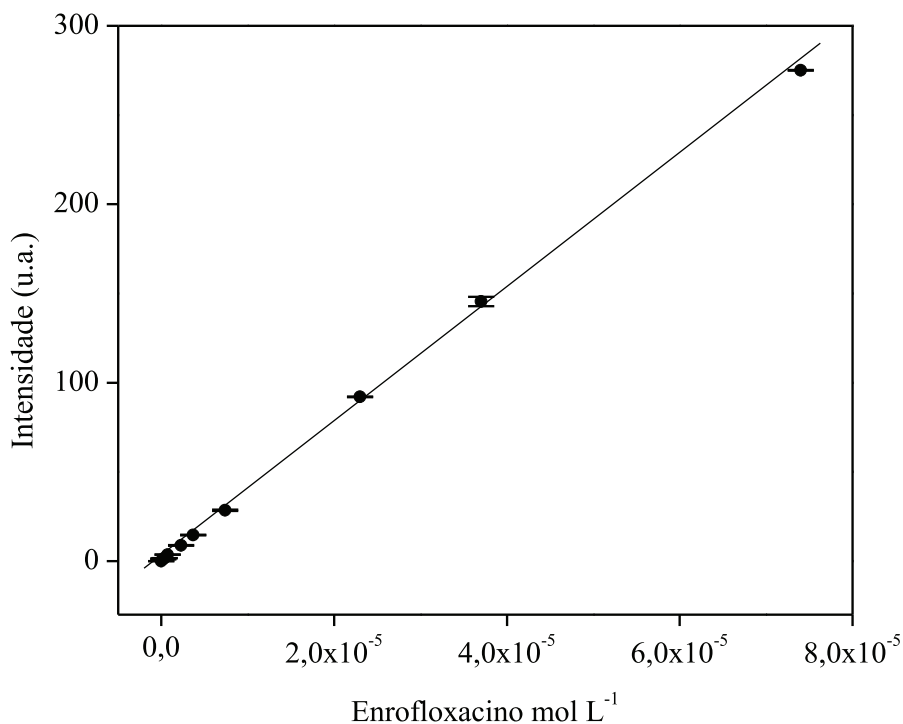


Figura 28 Curva analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹ (n = 3). $\lambda_{\text{excitação}}=370$ nm, $\lambda_{\text{emissão}}=448$ nm.

9.3. Análise dos resíduos em função da concentração da curva analítica para o procedimento para a determinação de enrofloxacino

O gráfico dos resíduos em função da concentração permite verificar a existência de anormalidades deixadas pela equação de regressão da curva analítica. A distribuição dos resíduos deve ser aleatória, possibilitando verificar a existência de anormalidade. Observa-se na Figura 29, que os resíduos obtidos em função da concentração não são maiores que o desvio padrão da equação de regressão ($s_y=3,5020$) (SILVA & COLLINS, 2011).

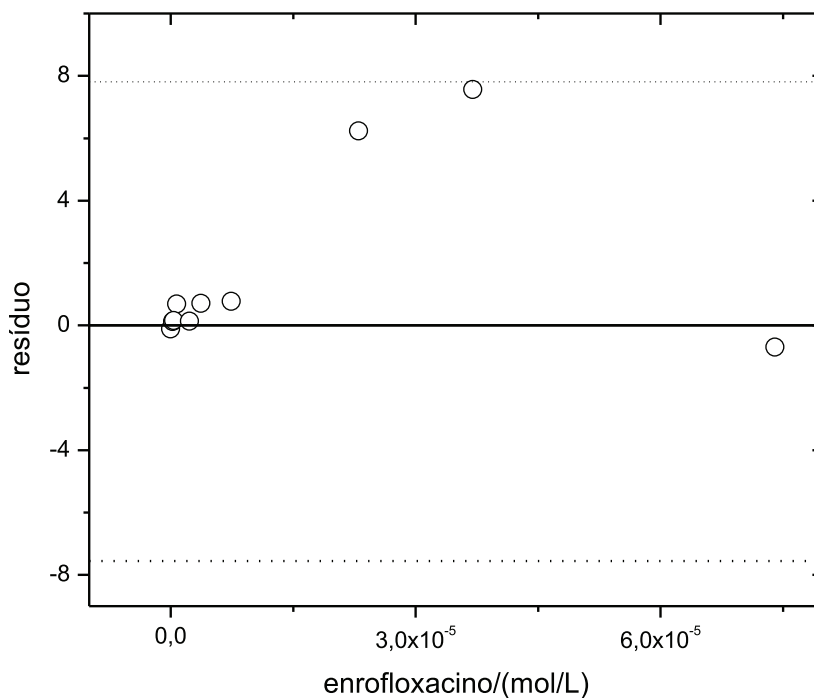


Figura 29 Gráfico dos resíduos em função da concentração de enrofloxacino da curva analítica em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹.

9.4. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico

Os dados obtidos da curva analítica do procedimento proposto para a determinação de enrofloxacino foram submetidos a análise de variância. A ANOVA, apresentada na Tabela 22 permite avaliar a significância estatística da regressão. A curva analítica obtida apresentou F de 23.615,28 indicando a equação de regressão da curva analítica é estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%, pois o F crítico é de 5,976 (p=0,05) (TRIOLA, 2006).

Tabela 23. Análise de variância da curva analítica para determinação do enrofloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto

ANOVA	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Prob>F
Regressão	1	$1,46 \times 10^5$	$1,46 \times 10^5$	23615,28	$5,12 \times 10^{-12}$
Resíduo	6	37,08	6,18		
Total	7	$1,46 \times 10^5$			

O limite de detecção e quantificação calculados (Tabela 23) foram de $7,03 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,24 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Tabela 24. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação do enrofloxacino

Faixa linear	$7,40 \times 10^{-7}$ a $3,70 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹
Limite de detecção (3×s)	$7,03 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹
Limite de quantificação (10×s)	$1,24 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹

s= desvio padrão da regressão da curva analítica.

Foram obtidas curvas analíticas em diferentes dias e as equações foram comparadas (Tabela 24). Verificou-se um coeficiente de variação da sensibilidade de 10,9% e dos coeficientes lineares de 34%.

Tabela 25. Equações das curvas analíticas para determinação do enrofloxacino empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto

Equação da Curva Analítica	LD	LQ	r
	mol/L		
$I = 3,97 \times 10^6 (\pm 9,28 \times 10^4) \times C_{\text{enro}} + 0,23 (\pm 0,27)$	$5,50 \times 10^{-8}$	$1,80 \times 10^{-7}$	0,999
$I = 3,62 \times 10^6 (\pm 1,04 \times 10^5) \times C_{\text{enro}} + 0,48 (\pm 0,36)$	$8,0 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^{-7}$	0,999
$I = 3,23 \times 10^6 (\pm 8,16 \times 10^4) \times C_{\text{enro}} + 0,37 (\pm 0,17)$	$4,40 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-7}$	0,999

C_{enro} = Concentração de enrofloxacino em mol L⁻¹; r=coeficiente de regressão;

IC= $\pm s \times t_{\text{crítico}}$; g.l.=6; p=0,01, t=3,71;

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

9.5. Estudo da recuperação do enrofloxacino em águas

A exatidão do procedimento espectrofluorimétrico proposto para a determinação de enrofloxacino foi avaliada em diferentes matrizes de amostras: água de superfície, água de potável. Procedeu-se o teste de recuperação adicionando-se alíquotas de solução padrão de enrofloxacino nas amostras nas concentrações de $1,24 \times 10^{-6}$; $2,07 \times 10^{-6}$ e $4,14 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ juntamente com 10% v/v das amostras de água de potável e subterrânea. Os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados.

Foram avaliadas três amostras, das quais duas eram águas potáveis (tabela 20) e uma subterrânea (tabela 21).

Tabela 26. Ensaio de recuperação para a determinação do enrofloxacino em água de superfície, em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação (%)	t_{calculado}
Norfloxacino / mol L⁻¹			
$1,24 \times 10^{-6}$	$1,86 \times 10^{-6}$	98,3	-1,09
$2,07 \times 10^{-6}$	$2,91 \times 10^{-6}$	93,9	
$4,14 \times 10^{-6}$	$6,24 \times 10^{-6}$	101	

^(a) Média \pm desvio padrão, n=3. t_{crítico} (90 %)=2,92.

Tabela 27. Ensaio de recuperação para a determinação do enrofloxacino em água de potável, em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação (%)	t_{calculado}
Norfloxacino / mol L⁻¹			
$1,24 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-6}$	166	9,12
$2,07 \times 10^{-6}$	$3,88 \times 10^{-6}$	187	
$4,14 \times 10^{-6}$	$8,16 \times 10^{-6}$	197	

^(a) Média \pm desvio padrão, n=3. t_{crítico} (90 %)=2,92.

Observou-se que os valores de recuperação para as águas foram entre 93,3 a 101%. Podemos verificar que não existe influência da matriz em relação aos resultados, já que estão dentro dos limites de 80 a 120% como descrito na literatura (ANVISA 2003).

Tabela 28. Procedimentos descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino

Técnica	Amostra	Linearidade	LD	LQ	Recuperação (%)	Referência
Proposto	Água	$7,40 \times 10^{-7}$ a $3,70 \times 10^{-5}$ mol/L ⁻¹	19,5 µg/L ⁻¹	64,7 µg/L ⁻¹	93,3-101	
HPLC	Água	20,0-500 µg/L ⁻¹	0,27 µg/L ⁻¹	NI	84,0-119	LUACES et al, 2013
HPLC	Leite	10,0-50,0 µg/L ⁻¹	2,28 µg/L ⁻¹	7,62µg/L ⁻¹	95,9 - 99,7	PIÑERO et al, 2013
ELISA	Frango	NI	0,02 µg/L ⁻¹	0,14µg/L ⁻¹	81,0 - 115	WANG et al, 2014
HPLC	Mel	0,02-0,20mg/kg	8,0 µg/L ⁻¹	20,0µg/L ⁻¹	82,1 - 110	TAYEB et al, 2016
CLEIA	Leite	0,35-1,0 ng/ml	0,00005 µg/L ⁻¹	NI	92,4 - 105	YU et al, 2014
Quimiluminescência	Leite	6,43-90,0ng/ml	0,0026 µg/L ⁻¹	0,0242 µg/L ⁻¹	89,2 - 108	NI et al, 2014

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência; **NI** - Não informado pelo autor; **LQ** - Limite de quantificação; **LD** - Limite de detecção.

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE NORFLOXACINO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

10. Caracterização espectroscópica de solução de norfloxacinó

Empregou-se uma solução de norfloxacinó $3,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido acético, 1%, para a determinação dos comprimentos de onda de excitação e de emissão máximas. Os espectros de fluorescência do norfloxacinó (Figura 30) evidenciam como λ máximo de excitação ao redor de 370 nm e de emissão em 446 nm.

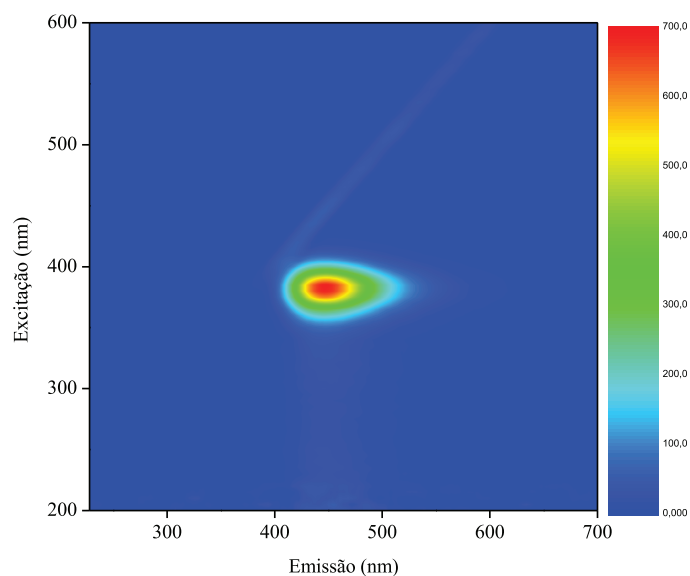


Figura 30. Matriz de excitação e emissão do norfloxacinó $3,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

10.1. Efeito da composição do meio na emissão do norfloxacinó

A influência da concentração do meio reacional sobre a intensidade do sinal espectrofluorimétrico do Norfloxacinó foi investigada em diferentes concentrações de ácido e base. A relação entre sinal de intensidade máxima vs. Concentração do meio

reacional é mostrado nas Figura 31. O efeito da concentração sobre a intensidade de emissão foi avaliado em soluções de ácido clorídrico, ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, cuja concentração foi ajustada para valores compreendidos entre 0,001 e 1,0.

Observou-se nos gráficos de intensidade máxima *vs.* Concentração do meio reacional, que com o aumento da concentração do hidróxido de sódio o sinal foi completamente suprimido em relação a fluorescência, isto pode ser explicado pela alta concentração de OH^- presentes na solução, que podem acarretar um efeito chamado de “filtro interno”, impedindo que a luz da fluorescência da molécula chegue ao detector. Os sinais em relação ao ácido sulfúrico e clorídrico também sofrem supressão do sinal com a diminuição da concentração do meio reacional. A solução de ácido clorídrico foi a que demonstrou melhores resultados em relação a intensidade dos analitos, destacando-se a concentração de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ o qual foi utilizado para a realização do procedimento.

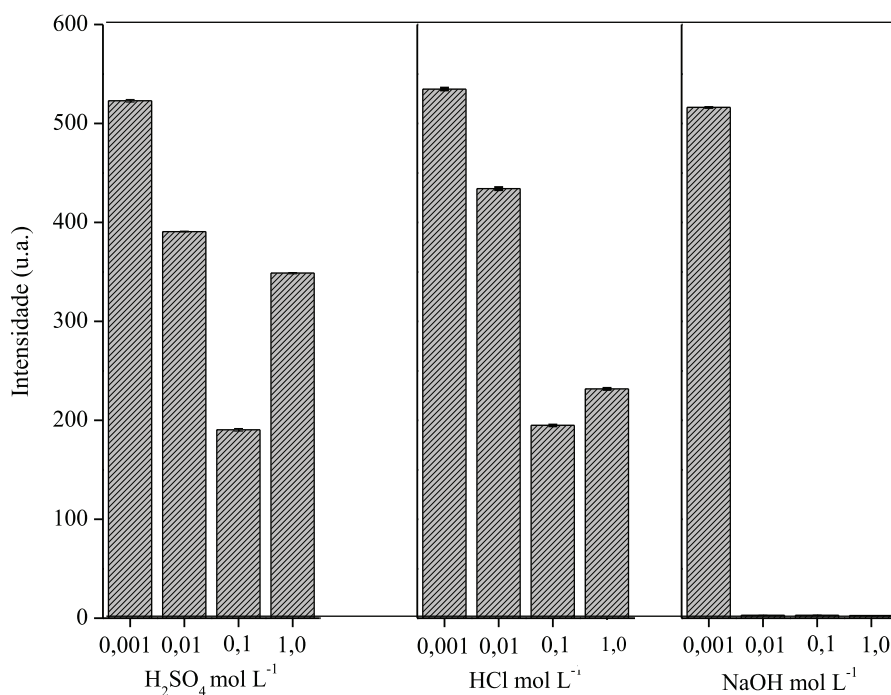


Figura 31. Efeito da concentração de H_2SO_4 , HCl e NaOH na intensidade de emissão do Norfloxacin.

10.2. Parâmetros de confiança analítica do procedimento espectrofluorimétrico para a determinação do norfloxacin

Sob as condições de concentração do meio reacional, λ máximo de excitação otimizados, obteve-se a curva analítica, com relação linear entre intensidade de emissão e a concentração de norfloxacin no intervalo de $1,90 \times 10^{-7}$ a $3,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A curva analítica pode ser descrita pela equação de regressão linear: $I = 4,56 \times 10^6 (\pm 5,18 \times 10^4) \times C_{\text{nor}} + 0,23 (\pm 0,11)$; onde I é a intensidade de emissão (u.a) ($\lambda_{\text{excitação}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{emissão}} = 446$ nm) e C_{nor} a concentração de norfloxacin em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de regressão linear de 0,9998

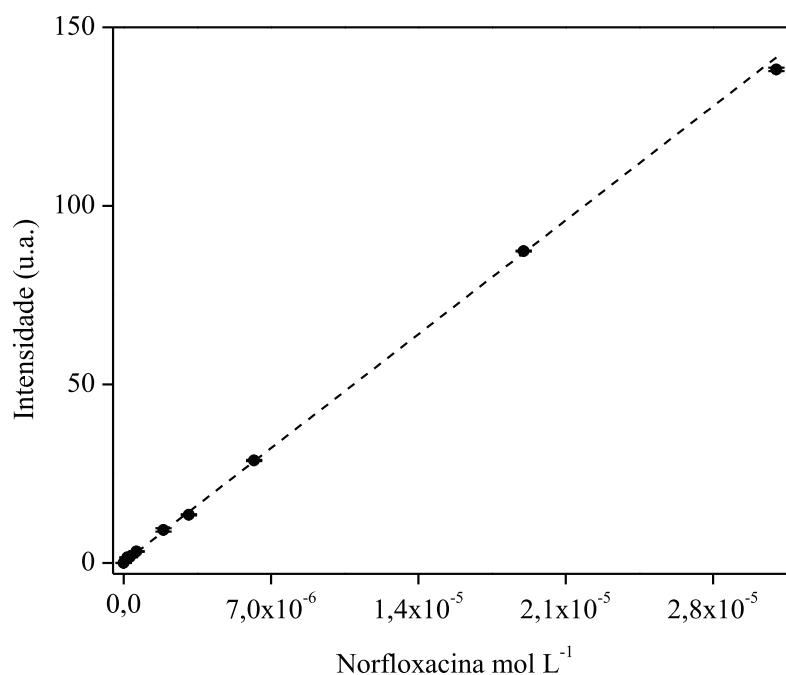


Figura 32. Curva analítica para determinação do norfloxacin empregando procedimento espectrofluorimétrico proposto em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹ (n = 3), $\lambda_{\text{excitação}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{emissão}} = 446$ nm.

10.3. Análise dos resíduos em função da concentração do analito na curva analítica para a determinação de norfloxacin

Avaliou-se a os resíduos em função da concentração obtidos com a equação de regressão da curva analítica obtida empregando o procedimento espectrofluorimétrico

proposto. O gráfico de resíduos permite identificar *outlier* durante a construção da curva da norfloxacino. Como mostrado na Figura 33, não se verifica outlier, pois nenhum dos pontos apresentaram resíduos maior que 2 vezes o valor do desvio padrão da linha de regressão obtida na curva analítica ($s_y=8,266$).

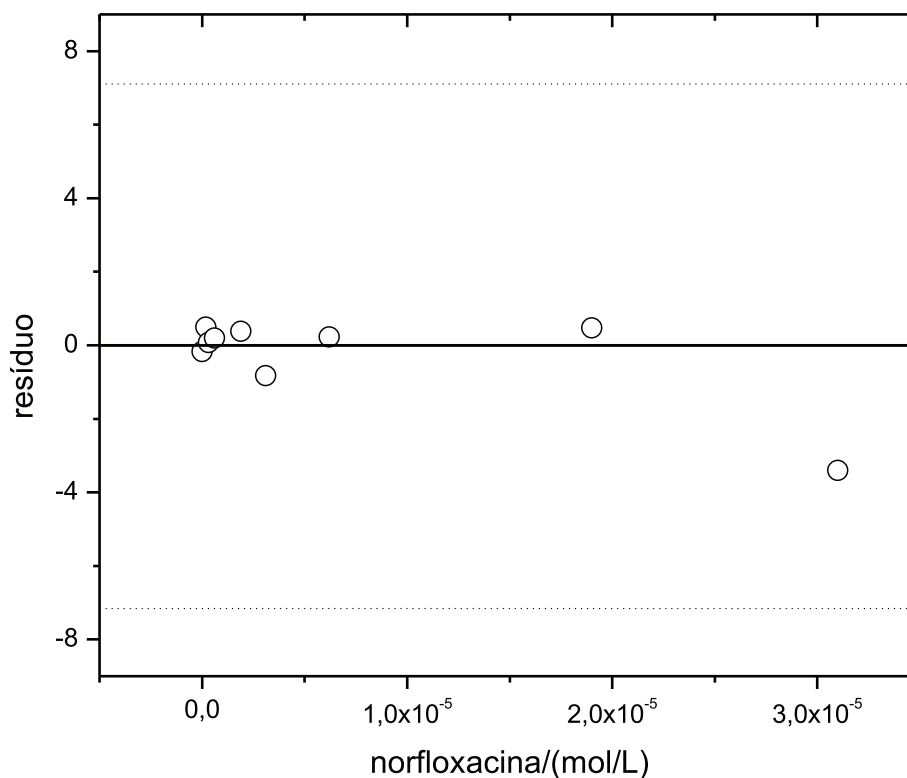


Figura 33. Gráfico de resíduos em função da concentração do norfloxacino em ácido clorídrico $0,001 \text{ mol L}^{-1}$.

10.4. Determinação dos parâmetros de confiabilidade analítica para determinação de norfloxacino empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto

Avaliou-se a significância estatística da equação de regressão obtida da curva analítica do procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de norfloxacino. A ANOVA obtida, apresentada na Tabela 28 apresenta o valor de F de 17,974 maior que o $F_{\text{crítico}}$ de 5,976 ao nível de confiança de 95%. Isto indica que a equação de regressão da curva é estatisticamente significativa para a determinação do analito (TRIOLA, 2006).

Tabela 29. Análise de variância da curva analítica para determinação do norfloxacino empregando o procedimento proposto

	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	Significância F
Regressão	1	$3,77 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5$	17.974	$1,16 \times 10^{-11}$
Resíduo	6	37,08	21,02		
Total	7	$3,77 \times 10^5$			

O limite de detecção obtido foi de $7,03 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O limite de quantificação foi de $1,24 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Tabela 29).

Tabela 30. Parâmetros de confiabilidade analítica do procedimento espectrofluorimétrico proposto para determinação do norfloxacino

Faixa Linear	$1,90 \times 10^{-7}$ a $3,10 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹
Limite de Detecção (3×s)	$7,03 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹
Limite de Quantificação (10×s)	$1,24 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹

s= desvio padrão da regressão da curva analítica.

Obtiveram-se as equações das curvas analíticas para a norfloxacino e os coeficientes de correlação (Tabela 30). As inclinações das curvas analíticas demonstram boa sensibilidade ao procedimento. Verifica-se que existe linearidade pelos resultados dos coeficientes de regressão maiores que 0,99 (ANVISA 2003). Avaliou-se possíveis interferentes em relação as regressões lineares empregando a realização de novas curvas respeitando-se um intervalo de 24 horas, sete a trinta dias entre as análises para construção das curvas analíticas. O coeficiente de variação entre as sensibilidades das curvas analíticas foi de 15%, enquanto o coeficiente de variação dos coeficientes lineares foi de 30%.

Tabela 31. Equações das curvas analíticas para determinação do norfloxacino empregando o procedimento proposto

Equação da curva analítica	LD	LQ	r
	mol/L		
$I = 4,53 \times 10^6 (\pm 1,22 \times 10^5) \times C_{\text{nor}} + 0,59 (\pm 0,48)$	$8,61 \times 10^{-8}$	$2,87 \times 10^{-7}$	0,9998
$I = 3,87 \times 10^6 (\pm 1,08 \times 10^5) \times C_{\text{nor}} + 0,68 (\pm 0,63)$	$1,32 \times 10^{-7}$	$4,39 \times 10^{-7}$	0,9997
$I = 3,11 \times 10^6 (\pm 1,00 \times 10^5) \times C_{\text{nor}} + 0,44 (\pm 1,00)$	$2,60 \times 10^{-7}$	$8,68 \times 10^{-7}$	0,9998

I=intensidade de emissão u.a.; C_{nor} : concentração de norfloxacino em mol L⁻¹.

10.5. Estudo da recuperação do norfloxacino em águas empregando o procedimento espectrofluorimétrico proposto

Observou-se a exatidão do procedimento para determinação de norfloxacino matrizes ambientais e de origem animal empregando-se do estudo de recuperação. Procedeu-se o teste de recuperação, empregando as seguintes concentrações do analito: $1,90 \times 10^{-6}$; $3,10 \times 10^{-6}$ e $6,20 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, as quais foram adicionadas a 10% de amostras (v/v) e analisadas pelo procedimento desenvolvido. Foram analisadas três amostras: água de superfície e água potável. (Tabela 26, 27 e 28).

Tabela 32. Ensaio de recuperação para a determinação do norfloxacino em água de superfície em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado ^(a)	Recuperação/%	t _{calculado}
Norfloxacino / mol L ⁻¹			
$1,90 \times 10^{-6}$	$1,87 \times 10^{-6} \pm 3,1 \times 10^{-8}$	98,3	-1,09
$3,10 \times 10^{-6}$	$2,91 \times 10^{-6} \pm 3,6 \times 10^{-8}$	93,9	
$6,20 \times 10^{-6}$	$6,24 \times 10^{-6} \pm 4,8 \times 10^{-8}$	101	

(a) Média \pm desvio padrão. n=3. t_{crítico} (95%)=4,30.

Tabela 33. Estudo de recuperação para a determinação do norfloxacino em água de potável em ácido clorídrico 0,001 mol L⁻¹.

Adicionado	Encontrado^(a)	Recuperação/%	t_{calculado}
Norfloxacino / mol L⁻¹			
1,90×10 ⁻⁶	2,00×10 ⁻⁶ ±4,6×10 ⁻⁸	105	4,75
3,10×10 ⁻⁶	3,26×10 ⁻⁶ ±2,6×10 ⁻⁸	105	
6,20×10 ⁻⁶	6,74×10 ⁻⁶ ±5,6×10 ⁻⁸	109	

(a) Média ± desvio padrão. n=3. t_{crítico} (95%)=4,30.

Observou-se que os valores de recuperação para as águas foram entre 93,91 a 108,7%. Podemos verificar que não existe influência da matriz em relação aos resultados, já que estão dentro dos limites de 80 a 120%.

Os procedimentos propostos (Tabela 34) para a detecção dos antibióticos enrofloxacino e norfloxacino demonstram resultados muito próximos entre si, tais resultados podem ser caracterizados devido à grande semelhança estrutural destes dois compostos os quais são pertencentes a classe das fluorquinolonas de segunda geração, o norfloxacino teve um resultado melhor em relação ao limite de detecção quanto ao enrofloxacino já as faixas de recuperação para ambos estão dentro dos limites permitidos pela literatura.

Tabela 34. Comparação para os procedimentos propostos entre os antibióticos enrofloxacino e norfloxacino

Parâmetros	Enrofloxacino	Norfloxacino
Limite de quantificação	1,80 × 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	2,87 × 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
Limite de detecção	5,40 × 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	8,61 × 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹
Faixa linear	7,40×10 ⁻⁷ a 3,70 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	1,90×10 ⁻⁷ a 3,10 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
Equação da curva analítica	I= 3,97 × 10 ⁶ (±2,5×10 ⁴) × C _{ENRO} + 0,23 (±0,072)	I= 4,53 × 10 ⁶ (±3,3×10 ⁴) × C _{NOR} + 0,59 (±0,13)
Recuperação	93,3 a 101%	93,9 a 108%

I: intensidade de emissão; C: concentração em mol/L⁻¹.

Tabela 37. Procedimentos descritos na literatura para a determinação de Norfloxacino.

Técnica	Amostra	Linearidade	LD	LQ	Recuperação	Referência
Proposta	Água	$1,9 \times 10^{-7}$ a $3,10 \times 10^{-5}$ mol/L ⁻¹	27,5 µg/L ⁻¹	92,0 µg/L ⁻¹	93,9-108	
ELISE	Água	0,1-10µg/L ⁻¹	2,30 µg/L ⁻¹	NI	70-105	CUI et al, 2011
Fluorescência	Leite	$1,68 \times 10^{-5}$ – $5,64 \times 10^{-6}$ mol/L ⁻¹	2,42 µg/L ⁻¹	NI	97,6-101,8	YI et al, 2011
Voltametria	Urina	0,1-100 µmol/L ⁻¹	15,6 µg/L ⁻¹	NI	97,2-103,8	HUANG et al, 2008
Voltametria	Urina	$0,5 \times 10^{-6}$ – 50×10^{-6}	90,4 µg/L ⁻¹	NI	98,6-102,17	GOYAL et al, 2012
Quimiluminescência	Soro e Urina	$1,34 \times 10^{-8}$ - $5,44 \times 10^{-6}$	0,003 µg/L ⁻¹	NI	90-104	SUN et al, 2009
UV-vis	Água	0,20-5,0 mg/mL ⁻¹	120 µg/L ⁻¹	450 µg/L ⁻¹	NI	PRASERTOYAI et al, 2015
Voltametria	Urina	$1,10 \times 10^{-7}$ – $8,0 \times 10^{-6}$	14,7 µg/L ⁻¹	31,2 µg/L ⁻¹	102-130	SILVA et al, 2015
Eletroluminescência	Urina	$1,0 \times 10^{-9}$ – $4,0 \times 10^{-7}$	0,22 µg/L ⁻¹	NI	98-101	ZHU et al, 2014

UV-Vis - Absorção molecular; **NI** - Não informado pelo autor; **LQ** - Limite de quantificação; **LD** - Limite de detecção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos espectrofluorimétrico propostos para determinação destas substâncias com atividade biológicas são simples, rápidos, baratos e não necessitam de analistas especializados.

Os parâmetros de confiabilidade analítica são comparáveis com aqueles procedimentos descritos na literatura. Uma diminuição no limite de detecção e quantificação podem ser alcançados pelo emprego de um preparo de amostra, como extração em fase sólida.

Os procedimentos propostos são uma alternativa na determinação destas substâncias, quando não há a necessidade de determinação sequencial dos analito, como ocorre em procedimentos cromatográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLÁN, C. L.; GUILLÉN, I.; ROS, M. T. M; MARTÍNEZ, A. S.; DELICADO, E. N.; GABALDÓN, J. A. Fluorimetric determination of sulphathiazole in honey by means the formation of CDs inclusion complexes C. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 87-93, 2014.

AHN, Y.; LINDER, S. W.; VEACH, B. T.; YAN, S. S.; FERNÁNDEZ, A. H.; PINEIRO, S. A.; CERNIGLIA, C. E. In vitro enrofloxacin binding in human fecal slurries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62. p. 74-84, 2012.

ANVISA - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos **Resolução RE nº 899**, de **29 de maio de 2003**.

ANKLEY, G. T.; JENSEN, K. M.; DURHAN, E. J.; MAKYNEN, E. A.; BUTTERWORTH C. B.; KAHL, M. D.; VILLENEUVE, D. L.; LINNUM, A.; GRAY, L. E.; CARDON, M.; WILSON, V. S. Effects of Two Fungicides with Multiple Modes of Action on Reproductive Endocrine Function in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicological Sciences**, n. 86 (2), p. 300-308, 2005.

BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulphonamides in the environment and their influence on human health. **The Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1-15, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Artmed, Porto Alegre, 2ª ed., 2008.

BERTESTEAN, S.; TRIARIDIS, S.; STANKOVIC, M.; LAZAR, V.; CHIFIRIUC, M. C.; VLAD, M.; GRIGORE, R. Polymicrobial wound infections: Pathophysiology and current therapeutic approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 119-126, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, (4), p. 523-530, 2003.

BOLON, M. K. The Newer Fluoroquinolones. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23 (4), p. 1027-1051, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Compêndio de produtos veterinários – SINDAN**. Brasília: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2012.

CATELANI, T. A.; TÓTH, I. V.; LIMA, J. L. F. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell. **Talanta**. v. 121, p. 281-287, 2014.

CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates

and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basinz Catalonia, N. E. Spain. **Analytical and bioanalytical chemistry** , v. 385, (6), p. 992-1000, 2006.

CHITESCU, C. L.; KAKLAMANOS, G.; NICOLAU, A. J.; STOLKER, A. A. M. High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surfacewater using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. **Science of the Total Environment**. v. 532, p. 501-511, 2015.

COMMISSION, EUROPEAN (2010). Commission Regulation (EC) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L, 15, 1–72.

CUI, J.; ZHANG, K.; HUANG, Q.; YU, Q.; PENG, X. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 84-89, 2011.

DOLLIVER, H.; KUMAR, K.; GUPTA, S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 36, p. 1224-1230, 2007.

EICKHOFF, P.; HEINECK, I.; SEIXAS, L. J. Gerenciamento e destinação final de medicamentos: uma discussão sobre o problema. **Revista Brasileira de Farmácia**, v, 90 (1), p. 64-68, 2009.

EMAMI N., SÖDERHOLM K. J. Dynamic mechanical thermal analysis of two light-cured dental composites. **Dent. Mater.** v.21, p. 977-983, 2005.

EMA. **Revised Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38**. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, 17 Nov. 2008.

FEDOROVA, G.; NEBESKY, V.; RANDAK, T.; GRABIC, R. Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. **Chemical Papers**, v. 68 (1), p. 26-36, 2014.

FICK, J.; SODERSTROM, H.; LINDBERG, R. H.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, J. D. G. Contamination of surface, group, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, (12), p. 2522-2527, 2009.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal chemistry**. 5th ed. New York: Williams and Wilkins, 2002.

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

GARRISON A. W.; POPE J. D.; ALLEN F. R. GC/MS Analysis of organic compounds in domestic wastewaters, **Ann Arbor Science Publishers**, v. 18, p. 517-556, 1976.

GIL, D. B.; GARCIA, C. M.; CASTRILLO, A. M. P.; DIEZ, N. M. **Nuevos métodos de determinación de antibióticos y otros principios activos em alimentos, formulaciones zoosanitarias y fluidos biológicos**. Tese (Ciencias Químicas, Universidad de Extremadura, Barcelona - ESP, 2005.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

GOYAL, R. N.; RANA, A. R. S.; CHASTA, H. Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals. **Bioelectrochemistry**, v. 83, p. 46-51, 2012.

GRANJA, R. H. M. M.; LIMA, A. C.; SALERNO, A. G.; WANSCHER, A. C. B. A. Validation of a liquid chromatography with ultraviolet detection methodology for the determination of sulfonamides in bovine milk according to 2002/657/EC. **Food Control**, v. 28, p. 304-308, 2012.

HIRSCHA, R.; TERNESA, T.; HABERERA, K.; KRATZB, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 109-118, 1999.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6th ed.; Bookman, 2009.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 2304-2347, 2011.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, 2006.

HUANG, K. J.; LIU, Z.; XIE, W. Z.; YUAN, H. X. Electrochemical behavior and voltammetric determination of norfloxacin at glassy carbon electrode modified with multi walled carbon nanotubes/Nafion. **Colloids and Surfaces B**, v. 64, p. 269-274, 2008.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGCRE-008, **Orientações sobre Validações de Métodos de Ensaio Químicos**, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, revisão junho 2007.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**. Revisão 3. 2010.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, ICH Q2(R1), 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KILINC, E.; GUMGUM, B.; HAMAMCI, C.; AYDIN, F. Stability-Indicating High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Sulfanilamide in Human Urine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 714-720, 2009.

KHASHABA, P. Y. Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 923–932, 2002.

KLOKOVA, E. V.; DMITRIENKO, S. G. Spectrophotometric Determination of Sulfanilamides by a Condensation Reaction with p-Dimethylaminocinnamaldehyde. **Moscow University Chemistry Bulletin**. v. 63, (5), p.284-287 2008.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C.; CUNHA, B. C. A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003/2004.

KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 91, p. 96-102, 2013.

KUMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2354-2366, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Plenum Press, New York, 1983, Springer

LETZELA, M.; METZNER, G.; LETZEL, T. Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. **Environment International**, v. 35, p. 363-368, 2009.

LIN, T. C.; PAN, P.-T.; CHENG, S. S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 27–34, 2010.

LÓPEZ-SERNA, R.; PÉREZ, S.; GINEBRED, A.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste by online solid phase extraction-liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, n, v. 83, p. 410-424, 2010.

LUACES, M. D.; URRACA, J. L.; PÉREZ-CONDE, M. C.; ALFONSO, N. C. M.; VALDÉS-GONZÁLEZ, A. C.; GUTIÉRREZ, A. M.; MORENO-BONDI. M. C. Chemiluminescence analysis of enrofloxacin in surface water using the tris (1,10-

phenantroline)–ruthenium(II)/peroxydisulphate system and extraction with molecularly imprinted polymers. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 458-464, 2013.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 10-28, 2006.

MAUDENS, K. E; ZHANG, G; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 85–92, 2004.

MELO, S. A. S. M.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, p. 188-197, 2009.

MIRJANA, P. V.; GORDANA, V. P.; DUSAN, M. S.; LIDIJA, B. P. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70(1), p. 67-78, 2005.

MUHAMMAD, S. M.; NA, N.; SAFDAR, M.; LU, X.; MA, L.; HE, L.; OUYANG, J. Rapid trace level determination of sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 173-179, 2013.

NI, H.; ZHANG, S.; DING, X.; MI, T.; WANG, Z.; LIU, M. Determination of Enrofloxacin in Bovine Milk by a Novel Single-Stranded DNA Aptamer Chemiluminescent Enzyme Immunoassay. **Analytical Letters**, v. 47. (17), p. 2844-2856, 2014.

NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet–spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 41-247, 2006.

PASCHOAL, L.R., FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 105-113, 2003.

PÉREZ-RIVERA, A. A.; HU, T.; AARDEMA, M. J.; NASH, J. F. Evaluation of the genotoxicity of the imidazole antifungal climbazole: Comparison to published results for other azole compounds. **Mutation Research**, v. 672, p. 27-39, 2009.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.

PINA, E. S. **Antibióticos e Quimioterápicos na Clínica Veterinária de Pequenos Animais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

PIÑERO, M. Y.; FUENMAYOR, M.; ARCE, L.; BAUZA,; VALÁRCEL, M. A simple sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in raw goat milk. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 533-537, 2013.

PRASERTBOONYAI, K.; ARQUEROPANYO, O. A.; LIAWRAUNGRATH, B.; LIAWRAUNGRATH, S. L.; POJANAKAROON, T. Miniaturization of spectrophotometry based on micro flow analysis using norfloxacin as less-toxic reagent for iron determination. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 532-537, 2015.

PROENÇA, K. S.; OLIVEIRA, R. V. M.; GONÇALVES, M. M.; VILA, M. M. D. C. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise quantitativa de cetoconazol em xampus. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88(4), p. 187-190, 2007.

RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CELA, R. Transformation of phenazone-type drugs during chlorination. **Water Research**, v. 46 p. 2457-2468, 2012.

ROQUE, A. L. R. R.; ALMEIDA, M. G. L. S. F. Remoção de Compostos Farmacêuticos Persistentes da Águas: Efeitos no Ambiente e na Saúde Humana. **Dissertação (Engenharia Ambiental) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa**. Lisboa, p. 123, 2009.

SERESHTI, H; KHOSRAVIANI, M; AMINI-FAZL, M. S. Miniaturized salting out liquid-liquid extraction in acoupled-syringe system combined with HPLC-UV for extraction and determination of sulfanilamide **Talanta**, v. 121, p. 199-204, 2014.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x Resistencia Bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico** v.77, n.2, p. 363-369, 2010.

SILVA, H.; PACHECO, J.; SILVA, J.; VISWANATHAN, S.; DELERUE-MATOS, C. Molecularly imprinted sensor for voltammetric detection of norfloxacin, **Sensors and Actuators B**, v. 219, p 301-307, 2015.

SHI, X. Z.; MENG, Y.; LIU, J. H.; SUN, A. L.; LI, D. X.; YAO, C. X.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solidphase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal Chromatogr B**, v. 879, p. 1071-1076, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; **Fundamentos de Química Analítica**, 8th ed.; Thomson Learning, 2007.

SOUZA, M.V.N. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. **Minireviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.1019-1017, 2005.

SOUZA, N. C. SANTOS, A. B.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação de micro poluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. Fortaleza, **Tese (Engenharia Civil)** - Universidade Federal do Ceará. p. 183, 2011.

SUN, H.; CHEN, P.; WANG, F. A novel chemiluminescence reaction system for the determination of norfloxacin with Ag(III) complex. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 74, p. 819-824, 2009.

TAYEB-CHERIF, K.; PERIS-VICENT, J.; CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J. Use of micellar liquid chromatography to analyze oxolinic acid, flumequine, marbofloxacin and enrofloxacin in honey and validation according to the 2002/657/EC decision. **Food Chemistry**, v. 202, p. 316-323, 2016.

TREVISAN, M. G; POPPI, R. J. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, p. 69-81, 2003.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005

VELIKINAC, I.; CUDINA, O.; JANKOVIC, I.; AGBABA, D.; VLADMIROV, S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. **Il Farmaco**, v. 59, n. 5, p. 419-424, 2004.

VERTZONI, M. V.; REPPAS, C.; ARCHONTAKI, H. A. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of ketoconazole in canine plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 839, p. 62-67, 2006.

ZHU, Y.; SHU, G.; YANG, Y.; DONG, Q.; ZOU, L. Synthesis and electrochemiluminescence properties of a new ternary terbium complex and its application for the determination of norfloxacin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 727, p. 113-119, 2014.

ZUCCATO, E.; CALAMARI, D.; NATANGELO, M.; FANELLI, R. Presence of therapeutic drugs in the environment. **The Lancet North American Edition**, v. 355, p. 1789-1790, 2000.

YE, NENGSHENG; SHI, PEGHI; WANG, Q; LI, J. Graphene as Solid-Phase Extraction Adsorbent for CZE Determination of Sulfonamide Residues in Meat Samples. **Chomatographia**. v. 76, p. 553-557, 2013.

YI, Y. N.; LI, G. R.; WANG, Y. S.; ZHOU, Y. Z.; ZHU, H. M. Simultaneous determination of norfloxacin and lomefloxacin in milk by first derivative synchronous fluorescence spectrometry using Al (III) as an enhancer. **Analytica Chimica Acta**, v. 707, p. 128-134, 2011.

YU, F.; YU, S.; YU, L.; LI, Y.; WU, Y.; ZHANG, H.; QU, L.; HARRINGTON, P. B. Determination of residual enrofloxacin in food samples by a sensitive method of chemiluminescence enzyme immunoassay. **Food Chemistry**, v. 149, p.71-75, 2014.

WANG, Z.; ZHANG, H.; NI, H.; ZHANG, S.; SHEN, J. Development of a highly sensitive and specific immunoassay for enrofloxacin based on heterologous coating haptens. **Analytica Chimica Acta**, v. 820, p. 152-158, 2014.

WAGENLEHNER, F. M. E.; WULLT, B.; PERLETTI, G. Antimicrobials in urogenital infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 3-10, 2011.

WILLIAMS, R. T.; BRIDGES, J. W. Fluorescence of solutions: A review, **Journal of Clinical Pathology**, v.17, p. 371-384, 1964.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in analytical chemistry**. v. 18, p. 624-632, 1999.