

### 3

## 3.1. Materiais, instrumentação e procedimentos gerais

### 3.1.

#### Materiais e reagentes

Os padrões analíticos da tetrabenazina (98%) e tartrato de vareniclina (98%) foram obtidos da Sigma Aldrich (Brasil). O padrão de cloridrato de amitriptilina (98%) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (EUA). O material de referência farmacopéico de AMT (100,0%; lote No. 1061) foi obtido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brasil).

Para as análises de amostras reais foram adquiridos: um medicamento genérico contendo 25 mg de cloridrato de AMT por comprimido (EMS, Brasil); Xenazine®, que contém 25 mg de TBZ por comprimido (Cambridge Laboratories, Reino Unido); e Champix®, que contém 1 mg ou 0,5 mg de tartrato de VRN por comprimido (Pfizer, Brasil).

Para a preparação de soluções-tampão e fases móveis para uso no HPLC foram utilizados: ácido clorídrico (35% m/m) da Isofar (Brasil); ácido ortofosfórico (85% m/m), ácido acético, ácido bórico, hidróxido de sódio, citrato de sódio, fosfato ácido de potássio, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio adquiridos da Merck (Brasil), todos de grau analítico.

Os solventes orgânicos utilizados foram metanol e acetonitrila (Tedia, Brasil) foram todos de grau HPLC. As diluições em meio aquoso foram realizadas com água ultrapura produzida em um ultrapurificador Milli-Q A10 (Milipore, EUA).

Os procedimentos de extração em fase sólida foram realizados utilizando cartuchos Bond-Elut® com fase estacionária C18, 3 g (Agilent, EUA). Para a filtração de solventes e amostras a serem injetadas no HPLC foram utilizadas membranas de Teflon de 0,45 µm de diâmetro (Whatman, EUA) e um sistema de filtração de solventes a vácuo (RL New, Brasil).

## **3.2. Instrumentação**

### **3.2.1. Espectrofluorímetro**

Para as análises por espectrometria de fluorescência molecular utilizou-se o espectrofotômetro de luminescência modelo LS 55 (Perkin Elmer, EUA). Os principais componentes desse instrumento incluem uma fonte de excitação do tipo lâmpada de Xe pulsada com potência equivalente a 20 kW por 8  $\mu$ s de duração. O detector é um tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928 que opera até 900 nm. O monocromador é do tipo Monk-Gilieson, para ser utilizado nas faixas espectrais de excitação de 200 a 800 nm, e de emissão de 200 a 900 nm. Os espectros de emissão e de excitação foram obtidos com o programa FL Winlab® (Perkin Elmer). A intensidade do sinal de fluorescência de todas as substâncias medidas neste trabalho foi medida como altura de pico e expressa em unidades arbitrárias (u.a.).

### **3.2.2. Cromatógrafos**

Para adaptar a abordagem da determinação de fluorescência fotoinduzida à cromatografia e para a realização das análises para validação dos métodos desenvolvidos foram utilizados dois cromatógrafos à líquido de alta eficiência.

O cromatógrafo à líquido de alta eficiência (HPLC) série 1200 (Agilent Technologies, EUA) é composto por um micro degaseificador, uma bomba binária, um amostrador automático, um compartimento para coluna com controle termostático, um detector de fluorescência (DF) e outro absorciométrico do tipo arranjo de diodos (DAD). Os cromatogramas e as áreas de pico foram obtidos com o programa Agilent Chemstation (versão B.02.01, Agilent Technologies).

O cromatógrafo à líquido série 200 da Perkin-Elmer consistiu de um módulo degaseificador, uma bomba binária, um amostrador automático, um detector de fluorescência (equipado com uma lâmpada de xenônio como fonte de irradiação) um detector absorciométrico de um canal, um amostrador automático e uma interface analógico-digital modelo NCI 900. Esse sistema não continha um forno para regular a temperatura da coluna cromatográfica. O controle do equipamento, a obtenção dos cromatogramas e o cálculo das áreas

de pico foram obtidos utilizando o software TotalChrom® (Versão 6.1.1) da Perkin Elmer.

Os estudos para elucidar as estruturas dos fotoderivados da AMT foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo 7890A da Agilent, equipado com um detector do tipo seletor de massas (modelo 5795). O controle do equipamento e os dados cromatográficos foram coletadas pelo software proporcionado pelo fabricante (Agilent).

### **3.2.3. Espectrômetro de massas**

Para a realização de análises pela técnica de espectrometria de massas com espectrômetro por desorção de plasma com fonte de califórnio  $^{252}\text{Cf}$  ( $^{252}\text{Cf}$ -PDMS) foi utilizado um equipamento construído por Ponciano e Silveira (1996). O equipamento consistiu em uma fonte de fragmentos de fissão de  $^{252}\text{Cf}$  e um separador de massas do tipo tempo de voo (Ponciano e Silveira, 1996; Ponciano *et al.*, 2001). O equipamento foi operado no modo de detecção íons positivos, com uma diferença de potencial de 15 kV, e sob alto vácuo (pressão menor que  $5,0 \times 10^{-6}$  torr.) Os espectros de massas foram adquiridos no formato ASCII e tratados no software Origin® (Versão 6,0, Microcal, EUA).

### **3.2.4. Reatores fotoquímicos**

Para os procedimentos de derivatização fotoquímica foram utilizados dois reatores fotoquímicos construídos no laboratório. O primeiro reator (I), mostrado na Figura 9, tinha seis lâmpadas germicidas de mercúrio (cada uma com potência de 6 W) que emitem as linhas principais em 253 nm e na faixa entre 296 e 313 nm. As lâmpadas foram dispostas na estrutura circular interna de uma estufa fora de uso e, cada uma, foi conectada a um reator eletrônico de 9 W. As seis lâmpadas ligavam simultaneamente, isto é, não havia possibilidade de selecionar a quantidade de lâmpadas a serem ligadas ao mesmo tempo. Nenhum dispositivo de controle da temperatura interna do reator era disponível. Na base do gabinete interno havia uma bandeja de polipropileno onde foram acondicionados os tubos de quartzo com as soluções a serem expostas à radiação UV.

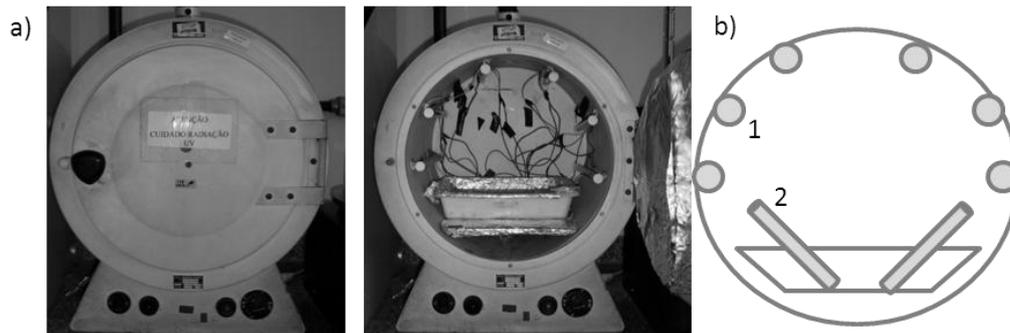


Figura 9 - Reator fotoquímico I: a) vista frontal e b) esquema de irradiação ( 1 = lâmpadas germicidas, 2 = tubos de quartzo)

O segundo reator fotoquímico (II), mostrado na Figura 10 tinha seis lâmpadas germicidas de mercúrio (cada uma com potência de 6 W). As lâmpadas foram dispostas na parte interna de um tubo de PVC de 40 cm de largura e com 20 cm de diâmetro. Cada uma das lâmpadas foi conectada a um reator eletrônico de 9 W e a configuração do circuito elétrico permitiu que as lâmpadas fossem ligadas aos pares (Antonio, 2013), de modo a se ter algum controle da radiância dentro do reator, conforme mostrado na Figura 10. Também foi instalado um microventilador, que manteve a temperatura interna do reator abaixo de 40 °C durante o período de irradiação das amostras.

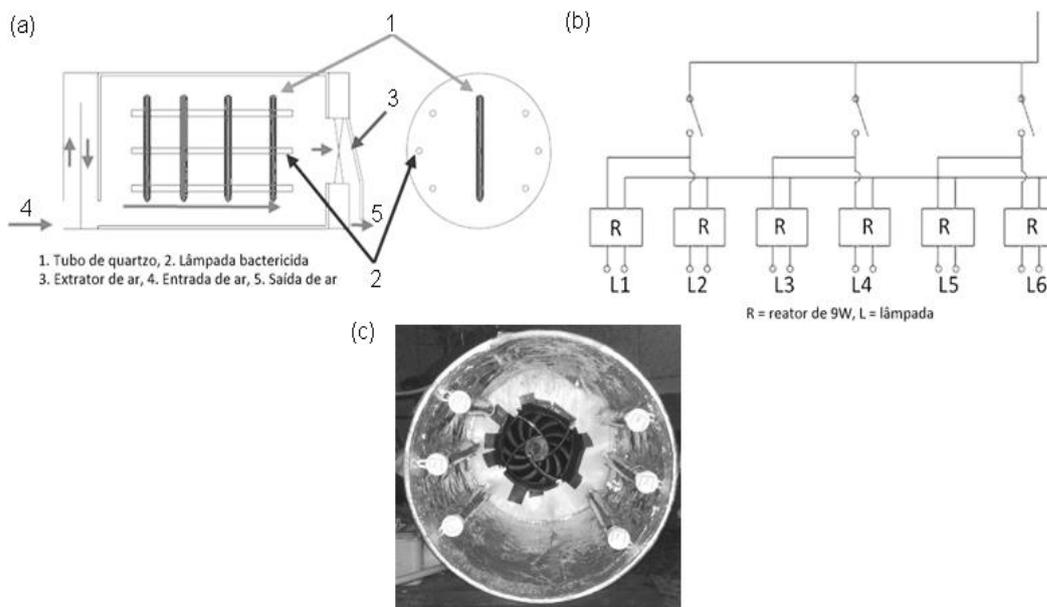


Figura 10 - Reator fotoquímico II: (a) esquema lateral (b) circuito elétrico e (c) vista frontal. Esquemas a e b adaptados de Antonio, 2013

### 3.3. Instrumentação, equipamentos e softwares complementares

Micropipetas automáticas (Labmate Soft, EUA) calibradas, de faixas entre 10 – 100  $\mu\text{L}$ ; 20 – 200  $\mu\text{L}$  e 100 – 1000  $\mu\text{L}$  foram utilizadas para as diluições. As medições de massa foram feitas em uma balança semi-micro analítica (0,001 mg; Shimadzu, Japão) e em uma semi-analítica (0,1 g; Bel Engineering, Itália). Um sistema de filtração (RL New, Brasil), com filtros de membrana de 0,47  $\mu\text{m}$  (Advantec, Tóquio) e uma bomba a vácuo, foi utilizado para a filtração dos solventes usados na preparação das fases móveis.

Uma centrífuga modelo Sorwal Biofugue Stratos, da Thermoscientific (EUA) foi utilizada na limpeza das amostras biológicas. Um banho ultrassônico com 9 L de capacidade (Unique Ultra Cleaner, Brasil) foi utilizado para eliminar os gases dissolvidos nos solventes. Um pHmetro (MS Technopon Group, Brasil) com eletrodo de membrana de vidro (conjugado com um de Ag/AgCl) foi usado nas medições de pH. Um agitador magnético (Fisatom, Brasil) e uma barra magnética de Teflon foram usados para manter a agitação das soluções durante os ajustes e medições dos valores de pH das soluções.

Os softwares Origin® (Microcal, EUA, versão 6,0) ou Excel 2010 (Microsoft, EUA) foram utilizados para o tratamento de dados: curvas analíticas, cálculos de médias, desvio padrão e geração de gráficos; e para o tratamento de espectros de massas, cromatogramas ou espectros de fluorescência. O software Eviews (Versão 3,1 Student Version, IHS Global, USA) foi utilizado para realizar uma análise de regressão mais completa de todas as curvas de calibração dos métodos desenvolvidos, incluídos no Anexo D.

### 3.4. Procedimentos de medição

#### 3.4.1. Análises por espectrofluorimetria

As medições de fluorescência foram obtidas utilizando uma velocidade de varredura de 1500  $\text{nm s}^{-1}$  e bandas passantes de emissão e de excitação de 15 nm. Os comprimentos de onda de emissão e de excitação ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ) utilizados nas determinações foram: 225/323 nm para a TBZ; 230/355 nm para o fotoderivado da TBZ; 233/345 nm ou 263/325 nm para a AMT após

fotoderivatização; 230/343 para a VRN e 248/380 para a VRN após fotoderivatização. Filtros de densidade ótica, quadrados de 50 x 50 mm e feitos em sílica semi-transparente de 25, 36 ou 50% de transmitância, medida em 632,8 nm (Newport, EUA e Melles-Griot, EUA), foram utilizados em medições que ultrapassavam a escala do equipamento (de 1000 unidades arbitrárias). Um fator de correção foi aplicado para ajustar os fatores de atenuação dos filtros em outros comprimentos de onda. Para encontrar tais fatores, as medições de fluorescência de soluções padrões dos analitos foram realizadas primeiramente sem o uso de filtro ( $I_{\text{inicial}}$ ) e depois com o uso do filtro ( $I_{\text{filtro}}$ ). Obviamente, ambas as soluções devem permitir a medição de sinal dentro da escala de trabalho abaixo de 1000 unidades arbitrárias. O fator de atenuação foi obtido pela razão  $I_{\text{inicial}}/I_{\text{filtro}}$ .

Para verificar a estabilidade dos fotoderivados, a intensidade da fluorescência de uma solução preparada de cada analito após derivatização fotoquímica foi medida em intervalos de 5 min durante 2 h após a reação; nos comprimentos de onda indicados para cada fotoderivado. Os estudos de estabilidade dos fotoderivados também foram realizados sob irradiação constante. Medições foram realizadas continuamente durante a irradiação da amostra (cerca de 30 min) no compartimento do espectrofotômetro de fluorescência nos comprimentos de onda máximos característicos de cada analito (fotoderivado), utilizando o modo Timedrive do software FLWinlab.

### **3.4.2. Separações cromatográficas**

As separações cromatográficas da TBZ foram realizadas a 40 °C utilizando o cromatógrafo a líquido da Agilent, uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (4,5 x 150 mm, C18) de tamanho médio de 5  $\mu\text{m}$ , uma vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  de fase móvel que consistia de acetonitrila e tampão de acetato de amônia (0,01  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 5) na proporção de 80:20% v/v. O modo de eluição foi isocrático e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . O tempo de retenção da TBZ foi de 2,71 min. Os comprimentos de onda de absorção utilizados no detector absorciométrico do tipo DAD foram: 210 230 e 240 nm para TBZ.

As separações cromatográficas da AMT e de seus fotoderivados foram realizadas nos sistemas de cromatografia a líquido da Agilent e da Perkin- Elmer, em uma coluna com fase estacionária reversa funcionalizada com o grupo ciano

(-C≡N), com 4,6 mm de diâmetro interno, 150 mm de largura e partículas de tamanho médio de 5 µm (SGE, Austrália). No detector absorciométrico, o sinal da AMT foi monitorado em 240 nm. Na detecção de fluorescência, o sinal do fotoderivado foi monitorado no par de comprimentos de onda de emissão e excitação 263/325. As separações foram realizadas utilizando uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>; fase móvel de tampão fosfatos (0,02 mol L<sup>-1</sup>, pH 3)/ metanol (40:60 v/v), volume de injeção de 50 µL e sem controle de temperatura. O fotoderivado da AMT teve um tempo de retenção de 2,63 min.

Para as análises de VRN por cromatografia a líquido foi utilizada uma coluna Xterra® de 4,6 x 150 mm; com partículas de tamanho médio de 5 µm e fase estacionária C18. No detector absorciométrico, o sinal da VRN foi monitorado em 238 nm. Na detecção fluorescência, o sinal do fotoderivado foi monitorado em 257/439 nm. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando tampão borato pH 10 (0,01 mol L<sup>-1</sup>) e metanol (40:60 % v/v), com uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, um volume de injeção de 50 µL e sem controle de temperatura na coluna. O tempo de retenção do principal fotoderivado foi de 2,97 min. Todas as soluções injetadas nos cromatógrafos a líquido foram filtradas com um filtro de membrana de Teflon de 45 µm (Whatman, EUA) antes da sua injeção.

Para análises por GC-MS, utilizou-se uma coluna capilar em material de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura, modelo GC DB-5MS (Agilent, EUA). A injeção das amostras de AMT, preparadas em 100% de acetonitrila foram feitas no modo *splitless*, a uma temperatura de 300 ° C. O gás hélio foi utilizado como carregador, a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi otimizada: (i) 60°C por 3 min; (ii) incremento até 250°C a uma razão de 10°C min<sup>-1</sup> e (iii) temperatura constante por 4 min. As condições de espectrometria de massa foram: (i) fonte de ionização de elétrons a 70 eV; (ii) temperatura do sistema a 230°C e (iii) tempo de corte do solvente (*cut-off time*) a 4,6 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de varredura total (m/z 20 – 500) e no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) a m/z 58, 191, 192, 193, 202, 205, 206, 215, 218, 232 e 277. A análise dos fotoderivados da AMT foi realizada utilizando o modo SIM.

### 3.4.3. Análises por $^{252}\text{Cf}$ -PDMS

Para os estudos da TBZ por  $^{252}\text{Cf}$ -PDMS foram analisadas soluções do padrão (100% metanol) e do fotoderivado (derivatização adaptada, seção 3.6), colocando as soluções em uma placa de aço inoxidável (200  $\mu\text{L}$ ) e secando-as em uma estufa a 37°C por 30 min. Após a evaporação total do solvente das amostras, a placa de aço foi introduzida no espectrômetro de massas.

### 3.5. Procedimentos para preparação de soluções e tratamento de amostras

Balões volumétricos calibrados de 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; ou 100,00 mL foram utilizados para a preparação das soluções. Para o método espectrofluorimétrico da TBZ (insolúvel em água), as soluções estoque padrão do analito em concentrações de  $10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  foram preparadas, dissolvendo a substância em 100% de metanol (10 mL). Todas as diluições da solução estoque do padrão foram realizadas com água ultrapura. As soluções estoque do medicamento, em concentrações de  $10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , foram preparadas dissolvendo uma quantidade adequada de medicamento em metanol (de acordo com o fim desejado), preparado a partir de pelo menos cinco comprimidos previamente pulverizados e homogeneizados. A solução resultante foi passada por um cartucho de SPE com fase estacionária C18 (Bond-Elut, Agilent), pré-condicionado com 1,0 mL de metanol e 1,0 mL de água ultrapura, para eliminar os interferentes e excipientes próprios do medicamento. O analito foi eluído com 2 mL de metanol em balão volumétrico (10,00 mL) cujo volume foi completado com água. Para a preparação das soluções na faixa linear do método, foram feitas soluções intermediárias ( $1,0 \times 10^{-5}$  ou  $5,0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) diluindo a solução estoque em balões de 10 mL com água, e as soluções de trabalho foram realizadas diluindo a solução intermediária com NaOH 5,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , para obter uma concentração final 0,45 mol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH no meio de reação. Quando necessário, as soluções do medicamento ou do padrão foram armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz, permanecendo estáveis por pelo menos um mês. A estabilidade das soluções armazenadas foi caracterizada pela medição da fluorescência nativa da solução de TBZ.

A solução estoque de AMT ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) foi preparada dissolvendo-se uma quantidade de massa do padrão de cloridrato de AMT em 100% água. A solução do medicamento foi preparada, pesando uma quantidade do medicamento, a partir de cinco cápsulas previamente trituradas e homogeneizadas, em 100% água. A solução resultante foi filtrada por um filtro de seringa com membrana de 0,45 µm, pré-condicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de água ultra pura, para eliminação dos excipientes. Para a preparação de solução do material de referência farmacopéico, a AMT (na forma de cloridrato) foi secada no vácuo por 2 h, prévio à pesagem do material. A solução estoque do material de referência farmacopéico foi pesada e dissolvida em água ultrapura. As soluções de AMT do padrão, do material de referência ou do medicamento foram preparadas semanalmente e armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz.

Para o tratamento de saliva, o fluido biológico de uma voluntária foi coletado após 2 h de ingestão de comida, e após lavagem bucal com aproximadamente 50 mL de água destilada. A saliva (2,0 mL) foi fortificada com TBZ e foram acrescentados 1,3 mL de solução de 50:50 acetonitrila/metanol (v/v). A solução foi agitada com auxílio de um agitador vórtex por 15 s e centrifugada a 5000 rpm por 15 min. O procedimento de agitação e centrifugação foi realizado por três vezes até a separação completa das proteínas. O sobrenadante foi passado por um cartucho de SPE preenchido com fase estacionária C18, pré-condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de água ultra pura. O cartucho foi lavado com 1 mL de água ultra pura e o analito foi eluído com 2 mL de metanol diretamente em um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foi acrescentado 0,90 mL de NaOH 5 mol L<sup>-1</sup> e o volume ajustado com água ultra pura. O procedimento de irradiação foi realizado como descrito anteriormente para as soluções de TBZ.

Amostras de sangue humano foram obtidas de um voluntário saudável, que não recebeu tratamento médico antes das análises. As amostras de sangue (volumes entre 3,0 e 3,5 mL) foram coletadas em tubos esterilizados de 4 mL (tampa vermelha), invertidas por cinco vezes e decantadas por 30 min. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 20 min. Aproximadamente 0,5 mL de plasma (sobrenadante) foi fortificado com solução padrão de AMT e centrifugada por 10 min a 3500 rpm. A solução foi passada por um cartucho de SPE C18, pré-condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de água ultra pura. O cartucho foi lavado com 4 mL de solução 90:10 de água/metanol (v/v) e o analito foi eluído utilizando 1 mL de solução de NH<sub>4</sub>Cl

(1%) em água metanol 1:99 (v/v), diretamente em um balão volumétrico de 10 mL. A derivatização da AMT foi realizada conforme descrito anteriormente.

### 3.5.1. Procedimentos de derivatização fotoquímica

O processo de irradiação de soluções no reator fotoquímico I foi realizado colocando de 3 a 5 mL de soluções do analito (TBZ em meio aquoso) em tubos de quartzo de 20 mL dentro de uma bandeja de polipropileno revestida de papel alumínio, posicionados a aproximadamente 45° das lâmpadas germicidas do reator fotoquímico I. O processo de irradiação de soluções no reator fotoquímico II foi realizado colocando soluções dos analitos AMT ou VRN (entre 1 e 5 mL) em tubos de quartzo com capacidade de 20 mL. Os tubos de ensaio foram colocados em uma estante de tubos e foram irradiados ligando as seis lâmpadas do reator.

Para estudos preliminares de irradiação de TBZ em diferentes valores de pH, soluções de  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de TBZ foram preparadas (n = 2) em (i) 100% água ultrapura; (ii) 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v; (iii) HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e (iv) NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Entre 1,0 e 3,5 mL; de soluções do analito foram colocadas em tubos de ensaio e irradiadas por 45 min no reator fotoquímico I. Para realizar os estudos preliminares da irradiação de TBZ em meio alcalino, uma solução de NaOH 5 mol L<sup>-1</sup> foi preparada para obter diluições de NaOH com concentração final entre 0,01 e 1 mol L<sup>-1</sup>. Para preparar soluções de TBZ sob condições ótimas, diluições da solução estoque de TBZ (faixa entre  $5 \times 10^{-8}$  e  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em NaOH 0,45 mol L<sup>-1</sup> foram colocadas em tubos de quartzo de 20 mL e irradiadas por 60 min no reator fotoquímico I.

Para os estudos da TBZ por <sup>253</sup>Cf-PDMS a solução do padrão do analito foi preparada com dissolução direta do padrão em 100% de metanol, na qual a concentração final ficou na faixa entre  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de TBZ. Sabendo-se que o sódio é um interferente da técnica <sup>252</sup>Cf-PDMS, contribuindo com o sinal de fundo, foi necessário substituir o hidróxido de sódio utilizado na derivatização fotoquímica, por solução de hidróxido de cálcio saturada. Ainda, dado que a amostra deve estar completamente seca antes da introdução ao espectrômetro de massas, foi necessário adicionar 20% de metanol ao meio de reação na solução do fotoderivado de TBZ. A solução do fotoderivado foi preparada irradiando por 60 min a solução em 20:80 MeOH/CaOH<sub>2(sat)</sub> v/v.

Para os estudos preliminares por fluorimetria, soluções de AMT de  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> foram diluídas em (i) água ultrapura; (ii) HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>; (iii) tampão fosfatos 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 3, 4 ou 7), (v) tampão carbonato (0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 10) e (vi) NaOH; 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Cada uma dessas soluções foi irradiada por 40 min. Os testes e a otimização da derivatização da AMT em HCl diluído foram realizados irradiando a solução do padrão de AMT ( $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) em meio de HCl entre 0,01 e 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A derivatização de AMT em condições ótimas para a fluorimetria ocorreu irradiando o analito no reator fotoquímico I, em solução de concentrações entre  $5 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 0,027 mol L<sup>-1</sup> por 60 min. Para o método por HPLC a derivatização da AMT (faixa de concentração entre  $2,5 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) foi realizada irradiando no reator fotoquímico II, por 30 min o fotoderivado diluído em tampão fosfato (pH 3; 0,02 mol L<sup>-1</sup>).

Para as determinações de AMT por GC-MS, a reação fotoquímica teve que ser realizada em 100% de ACN, dada a incompatibilidade da técnica em meio aquoso. A solução estoque dos analitos foi preparada em 100% de metanol ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). A partir dessa solução foram preparadas diluições de  $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$  de AMT ( $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) ou de VRN ( $1,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em 100% de ACN, e as soluções foram irradiadas por um intervalo entre 0 a 30 min para a separação da molécula original e os fotoderivados.

Para os testes preliminares, soluções de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de VRN foram irradiadas no reator fotoquímico II por 20 min em meio de NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup> ou HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Os estudos univariados em meio básico foram realizados irradiando soluções de VRN ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) em meio de NaOH na faixa entre 0,1 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>. As condições ótimas de derivatização da VRN (entre  $5,0 \times 10^{-8}$  e  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) em meio básico para o método fluorimétrico foram realizadas utilizando 23 min de irradiação em meio aquoso com NaOH 0,64 mol L<sup>-1</sup>. A derivatização fotoquímica foi adaptada para realizar a separação dos fotoprodutos por HPLC. Para tal, foi realizada irradiação do analito de 0 a 30 min em meio de (i) tampão borato 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 10) e (ii) NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup>. As condições ótimas de derivatização foram 10 min de UV em meio de tampão borato (pH 10; 0,01 mol L<sup>-1</sup>).

### 3.6. Desenvolvimento e validação de métodos

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos baseados na abordagem com derivatização fotoquímica foram realizados: (i) análises exploratórias utilizando experimentos univariados ou planejamentos fatoriais de modo a conhecer o comportamento das variáveis que afetam a reação fotoquímica; (ii) otimização multivariada de parâmetros experimentais utilizando planejamentos experimentais fatoriais (composto central) de modo a se obter informação suficiente para escolher as condições de trabalho.

Para a realização dos estudos multivariados utilizou-se um planejamento experimental fatorial. Esse planejamento tem a finalidade de verificar as variáveis mais relevantes que afetam o sinal analítico e identificar as possíveis interações entre elas de modo a se atingir, idealmente, a condição ótima para a resposta analítica (no caso a fluorescência). O planejamento experimental também pode facilitar o processo de otimização ao reduzir o número de experimentos necessários para se definir o modelo matemático apropriado para descrever a influência das variáveis que afetam a resposta analítica. Por sua vez, a redução do número de experimentos acarreta na redução de tempo de análises e custos (Calado e Montgomery, 2003). O modelo utilizado neste trabalho foi o planejamento do composto central (CCD), um planejamento fatorial ( $2^2$ ), ao qual foram acrescentados pontos orientados a  $45^\circ$  em relação aos pontos do planejamento de partida, o chamado planejamento em estrela, conforme mostrado na Figura 11 (Barros Neto, et al 2010).

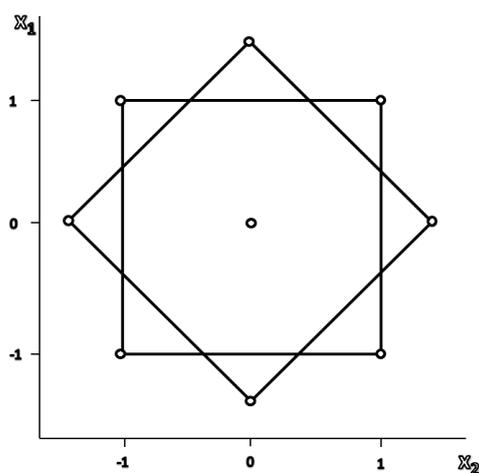


Figura 11 - Planejamento experimental em estrela mostrando pontos que indicam a combinação de níveis para as variáveis para cada um dos experimentos. Adaptado de Barros Neto et al., 2013

Nos planejamentos experimentais realizados para a otimização das variáveis de cada método, uma réplica em cada ponto (correspondente às arestas da Figura 11), com exceção do ponto central, onde medições um número maior de réplicas autênticas ( $n \geq 5$ ) foram realizadas. As respostas foram tratadas no software especializado (Statistica Versão 6.0, Microcal, EUA) para gerar o modelo matemático que explica os efeitos das variáveis dependentes sobre a variável independente, e os valores críticos ou otimizados para cada variável, podendo-se obter também, pelo método das derivadas parciais de cada variável do modelo. Em todos os casos, foi verificado que se o modelo matemático gerado descreve os dados mediante o ajuste do modelo (valor de  $R^2$ ), a análise visual da distribuição aleatória dos resíduos e uma análise de variância (Equações 2 e 3), realizadas utilizando o software Statistica:

$$F_{\left(\frac{v_{fa}}{v_{ep}}\right)} = MQ_{fa}/MQ_{ep} \quad (2)$$

Onde F é o valor do parâmetro da tabela de F calculado, com graus de liberdade da falta de ajuste<sup>14</sup> e do erro puro;  $MQ_{fa}$  é a média quadrática da falta de ajuste e  $MQ_{ep}$  é a média quadrática do erro puro,

$$\sigma_{max}^2 \% = \frac{SQ_t - SQ_{fa}}{SQ_t} \quad (3)$$

Onde  $\sigma_{max}^2$  é o máximo de variância explicada,  $SQ_t$  é a soma quadrática total,  $SQ_{fa}$  é a soma quadrática da falta de ajuste.

### 3.6.1. Parâmetros analíticos de mérito

A validação é um procedimento essencial que um laboratório deve seguir para produzir dados analíticos confiáveis. Muitos métodos são validados por organizações reconhecidas internacionalmente (ASTM<sup>15</sup>, AOAC<sup>16</sup>) ou em estudos de colaboração ou, ainda, são classificados como métodos oficiais. Nestes casos, ao serem implementados em um laboratório, esses métodos geralmente não precisam de outra validação, a menos que sejam utilizados para outro fim, como para amostras para as quais o método não foi desenvolvido, ou quando usado em condições diferentes das especificadas pelo método validado.

<sup>14</sup> Cálculo realizado quando a soma quadrática dos resíduos é decomposta em: (i) a falta de ajuste, atribuída aos resíduos que podem ser previstos utilizando mais componentes no modelo (ex. acrescentando interações quadráticas ou de maior ordem), e (ii) ao erro puro, atribuído ao erro experimental (Manual Eletrônico do Software Statistica, Microcal –EUA, V 6,0 )

<sup>15</sup> ASTM: The American Society for Testing and Materials

<sup>16</sup> AOAC: The Association of Analytical Communities

Ao contrário dos processos de controle de qualidade (uso de cartas de controle e análises de proficiência), que são realizados com frequência previamente estabelecida, a validação de métodos é realizada uma única vez, ou eventualmente durante o tempo de utilização do método, para a averiguação do desempenho do mesmo (Thompson et al., 2002). A validação de métodos geralmente é realizada se: (i) um novo método é desenvolvido; (ii) um método estabelecido é revisado para incorporar melhorias ou estendê-lo para outras especificações; (iii) o controle de qualidade indica que o método muda com o tempo; (iv) um método normalizado é utilizado fora dos escopos para os quais foi concebido; e (v) a equivalência entre dois métodos quer ser demonstrada (por ex. um novo método e um método de referência). (INMETRO, 2007; CITAC/EURACHEM, 2002).

Na validação de um método obtêm-se parâmetros analíticos de mérito com o intuito de verificar se estes são adequados ao uso pretendido, o chamado “*fitness for purpose*”. A seleção desses parâmetros depende de fatores como a aplicação, amostragem, o objetivo do método, regulamentações regionais ou internacionais, entre outros. Os parâmetros mais comuns a definir em uma validação são:

- I. *seletividade*, que se refere ao grau no qual um método pode quantificar um analito específico na presença de interferentes;
- II. *faixa de medição ou de trabalho*, que é a faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado;
- III. *tendência* (às vezes denominada de *recuperação*) é o erro sistemático de um sistema de medição;
- IV. *linearidade ou faixa de resposta linear* é a habilidade de um método analítico para produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras<sup>17</sup>, na faixa de trabalho do método. Caso algum método analítico não possua uma faixa linear definida, a resposta analítica pode ser descrita por outra função matemática adequada para indicar a concentração do analito<sup>18</sup>;
- V. *sensibilidade* que é um parâmetro que demonstra a variação da resposta analítica em função da variação da concentração do analito, e pode ser avaliada mediante o coeficiente angular da curva analítica;

---

<sup>17</sup> O coeficiente de correlação ( $r$ ) é utilizado para determinar a linearidade de um método.

<sup>18</sup> O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é utilizado para identificar se o modelo matemático escolhido representa os dados.

- VI. *limite de detecção (LD)*, que é a menor concentração do analito que pode ser detectada, sendo determinado analisando réplicas ( $n \geq 7$ ) do branco e calculando-se como:  $LD = x_b + ts_b$ <sup>19</sup>, onde  $x_b$  é a média do sinal do branco e  $s_b$  é o desvio padrão das medições do branco. Pode-se ainda usar a sensibilidade da curva analítica ( $m$ ) para calcular o LD como  $3s_b/m$ . Alternativamente, pode-se analisar réplicas do branco com adição da menor concentração perceptível do analito e usar  $LD = x + 3s$ ;
- VII. *limite de quantificação (LQ)*, que é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Calcula-se o LQ analisando réplicas ( $n \geq 7$ ) do branco e calculando-se como  $LQ = x_b + ks_b$  (onde  $k = 5, 6$  ou, mais comumente 10). Pode-se ainda usar a sensibilidade da curva analítica ( $m$ ) para calcular o LQ como  $10 s_b/m$ . Alternativamente, podem ser analisadas réplicas do branco com adição da menor concentração perceptível do analito e usar  $LQ = x + 10s$ ;
- VIII. *robustez* ou *solidez* que refere-se à estabilidade do desempenho de um método na presença de pequenas alterações em variáveis experimentais;
- IX. *precisão* de um método que é a declaração de proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e que geralmente é expressa como um desvio padrão e pode ser expressa como repetibilidade ou precisão intermediária. A *repetibilidade* é um tipo de precisão relacionada a medições de réplicas autênticas sob as mesmas condições experimentais, mesmo operador do mesmo laboratório em um curto período de tempo entre as medições. Neste trabalho a repetibilidade foi calculada como o coeficiente de variação ( $CV = \text{desvio padrão} / \text{média} \times 100\%$ ) das medições ( $n \geq 5$ ) feitas na mesma concentração e no mesmo dia. A *precisão intermediária*, ou reprodutibilidade interna é a precisão que reflete condições de reprodutibilidade, isto é, o mesmo método sendo testado em diferentes condições que podem ser diferentes laboratórios, equipamentos, dias de análise ou operadores. Neste trabalho, após comprovar que as variâncias dos resultados entre dias

---

<sup>19</sup>  $X$  = média dos valores da amostra,  $t$  = abscissa da distribuição de Student,  $s$  = desvio padrão de  $\geq 6$  medições do branco ou analito,;  $m$  = inclinação da curva analítica

diferentes de análise não foi significativa (teste F), a precisão intermediária foi calculada como o desvio padrão agrupado de medições de três diferentes concentrações dentro da faixa linear do método, realizadas em dias diferentes de análise (INMETRO, 2007).

### **3.6.2. Cálculo da incerteza de medição**

A incerteza de medição é definida no VIM<sup>20</sup> como o “parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos ao mensurando”. Em medições analíticas, geralmente o mensurando é um sinal analítico diretamente proporcional à concentração de um analito.

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores de uma medição dentro da qual o valor real deve estar situado, com um nível de confiança especificado. A incerteza pode ser expressa como um desvio padrão ou um múltiplo calculado do desvio padrão. Cada um dos processos que afetam uma medição, como amostragem, homogeneidade da amostra, calibração do instrumento, pureza dos reagentes, condições de medição, entre outros, possuem uma incerteza associada. A incerteza de medição envolve o cálculo dos valores de cada uma dessas incertezas associadas, da incerteza padrão combinada e da incerteza expandida. Os valores das incertezas associadas devem ser expressos como incertezas padrão, ou seja, desvios padrão, o que em alguns casos pode precisar de conversões (ISO, 1993; CITAC, 2012).

No presente trabalho, um estudo prévio (Da Cunha et al., 2008) foi utilizado para verificar as fontes de incerteza do processo de medição da concentração dos analitos, enquanto uma ferramenta gráfica (gráfico de Ishikawa) foi utilizada para identificar e agrupar as fontes de incerteza associadas com a determinação da concentração dos analitos nos métodos propostos, conforme mostrado na Figura 12.

---

<sup>20</sup> Vocabulário Internacional de Metrologia

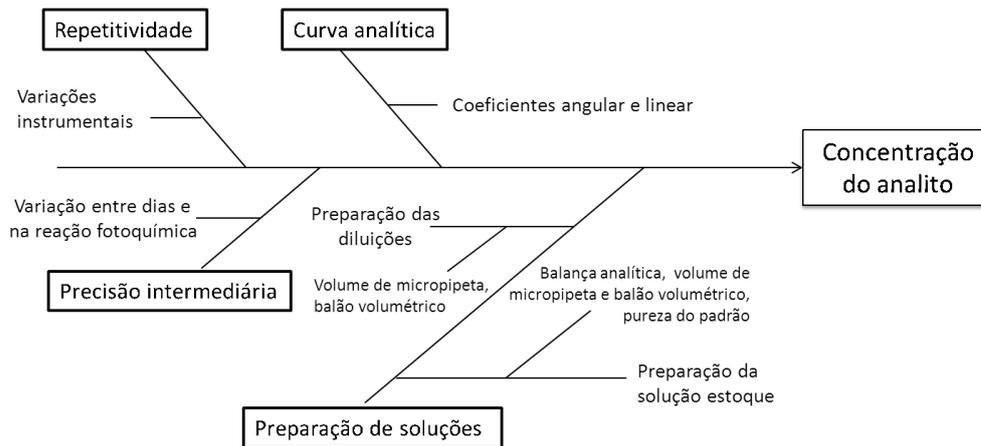


Figura 12 - Diagrama de Ishikawa para determinação de fontes de incerteza.

Como pode ser observado no diagrama, as principais fontes de incerteza identificadas nos métodos desenvolvidos neste trabalho foram agrupadas em: (i) a preparação de soluções ( $u_{sol}$ ); (ii) a curva analítica ( $u_{ca}$ ); (iii) a repetibilidade ( $u_{rp}$ ) e (iv) a precisão intermediária ( $u_{pi}$ ). O cálculo da incerteza combinada ( $u_c$ ) é dada pela soma quadrática de cada uma destas fontes de incerteza apontadas (ISO, 1993), conforme a Equação 4.

$$u_c = \sqrt{u_{sol}^2 + u_{ca}^2 + u_{rp}^2 + u_{pi}^2} \quad (4)$$

Onde  $u_{sol}$ ,  $u_{ca}$ ,  $u_{rp}$ , e  $u_{pi}$  são, respectivamente, as incertezas associadas à preparação de soluções, curva analítica, repetibilidade e precisão intermediária.

A incerteza expandida ( $U$ ) é calculada multiplicando o valor da incerteza combinada vezes o fator de abrangência  $k$ , obtido a partir do valor de graus de liberdade efetivos ( $u_{eff}$ ) descritos pela distribuição-t ou distribuição de Student. O valor de  $u_{eff}$  é obtido mediante a Equação 5.

$$u_{eff} = \frac{u_c^4}{\frac{u_{sol}^4}{n-1} + \frac{u_{ca}^4}{n-2} + \frac{u_{rp}^4}{n-1} + \frac{u_{pi}^4}{n-1}} \quad (5)$$

Para todos os métodos desenvolvidos, o cálculo da incerteza de medição foi feito para três concentrações diferentes, no início, no meio e no fim, de cada faixa linear de trabalho. O cálculo de cada uma das fontes de incerteza ( $u_{sol}$ ,  $u_{ca}$ ,  $u_{rp}$  e  $u_{pi}$ ) identificadas no processo de determinação da concentração dos analitos é indicado a seguir.

### 3.6.2.1. Incerteza associada à preparação de soluções

Para estimar incerteza associada à preparação de soluções, foram considerados os processos de (i) preparação da solução estoque e (ii) preparação das diluições do analito.

A incerteza associada à preparação da solução estoque do analito, leva em consideração os materiais e equipamentos envolvidos no processo de dissolução do padrão, as incertezas da balança analítica, do balão volumétrico e da pureza do padrão. Dado que: cada uma dessas fontes de incerteza é expressa em diferentes dimensões (gramas e mililitros); que as variações de cada componente são independentes entre si; e que existe uma equação matemática que relaciona cada uma das fontes de incerteza com a concentração do analito (Equação 6); foi utilizado o método das incertezas relativas ( $u = u_x/x$ ) (ISO, 1993; CITAC,2000) para calcular a incerteza associada a cada elemento utilizado na preparação da solução estoque, conforme indicado na Equação 7.

$$C_{estoque} = \frac{m \times \%P}{V_{bv} \times M} \quad (6) \quad u_{estoque} = C_{estoque} \sqrt{\frac{u_{ba}^2}{m} + \frac{u_{\%P}^2}{\%P} + \frac{u_{bv}^2}{V_{bv}}} \quad (7)$$

Onde  $C_{estoque}$  é a concentração da solução estoque,  $m$  é a massa do padrão,  $\%P$  é a pureza do reagente declarada pelo fornecedor,  $V$  é o volume do balão volumétrico e  $M$  é a massa molar da substância (considerada como constante para cada analito);  $u_{estoque}$  é a incerteza associada à preparação da solução estoque,  $u_{ba}$  é a incerteza da balança analítica;  $u_{\%P}$  é a incerteza associada à pureza do padrão analítico e  $u_{bv}$  é a incerteza associada ao balão volumétrico.

No caso da balança analítica e do balão volumétrico, os valores de  $u_{ba}$  e  $u_{bv}$  foram calculados dividindo a incerteza expandida ( $U$ ), pelo fator de abrangência  $k$ ,  $u = U/k$ , ambos informados pelo fabricante (Anexo B). No caso dos padrões analíticos, nos quais não foi fornecida nenhuma informação além da percentagem de pureza ( $\geq 98\%$  em todos os casos), teve que se assumir que essa percentagem possui uma distribuição retangular, com valores de % de pureza entre 96 e 100%. Assim,  $u_{\%P}$  foi calculada mediante a expressão:  $u_{\%P} = 2\%/\sqrt{3}$ .

Pelo fato da concentração da solução estoque (valores entre  $10^{-3} - 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ ) preparada para cada analito está em uma faixa de concentração muito acima das utilizadas nas faixas de trabalho dos métodos propostos (valores entre  $10^{-8} - 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ) fez-se necessário realizar diluições diretas da solução estoque ( $C_1$ ) ou ainda, soluções intermediárias ( $C_2$ ). Esse procedimento de

diluição é afetado pelas incertezas associadas à preparação solução estoque, as micropipetas ( $mp$ ) e aos balões volumétricos ( $bv$ ) utilizados. Dado que existe uma equação matemática que relaciona cada um desses fatores diretamente à concentração do analito (Equação 8) e, sendo as variações entre essas fontes de incerteza consideradas independentes entre si, foi utilizado o método das incertezas relativas para calcular a contribuição da incerteza associada à preparação das soluções ( $u_{sol}$ ), conforme mostrado nas Equação 9 e Equação 10.

$$C_1 = \frac{C_{estoque} \times V_{mp}}{V_{bv}} \quad (8) \quad u_{C1} = C_1 \sqrt{\frac{u_{estoque}^2}{C_{estoque}^2} + \frac{u_{mp}^2}{V_{mp}^2} + \frac{u_{bv}^2}{V_{bv}^2}} \quad (9)$$

Onde  $C_1$  é a concentração da solução preparada por diluição direta da solução estoque,  $V_{mp}$  é o volume da solução estoque obtido com a micropipeta volumétrica e  $V_{bv}$  é o volume do balão volumétrico;  $u_{sol1}$  é a incerteza associada à solução preparada por diluição direta da solução estoque,  $u_{mp}$  é a incerteza da micropipeta, analítica;  $u_{bv}$  é a incerteza do balão volumétrico.

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_{mp}}{V_{bv}} \quad (10) \quad u_{C2} = C_2 \sqrt{\frac{u_{C1}^2}{C_1^2} + \frac{u_{mp}^2}{V_{mp}^2} + \frac{u_{bv}^2}{V_{bv}^2}} \quad (11)$$

Onde  $C_2$  é a concentração da solução preparada por diluição da solução intermediária,  $V_{mp}$  é o volume da solução intermediária obtido com a micropipeta volumétrica e  $V_{bv}$  é o volume do balão volumétrico;  $u_{C2}$  é a incerteza associada à solução preparada por diluição da solução intermediária,  $u_{mp}$  é a incerteza da micropipeta, e  $u_{bv}$  é a incerteza do balão volumétrico.

A incerteza associada às micropipetas e ao balão volumétrico foi calculada utilizando os dados fornecidos pelo fabricante. A Equação 10 foi utilizada para o cálculo de  $u_{sol}$  no caso das soluções preparadas por diluição da solução estoque. Já a Equação 11 foi utilizada para o cálculo de  $u_{sol}$  nas soluções mais diluídas, nas quais foi necessário preparar uma solução intermediária.

### 3.6.2.2. Incerteza associada à curva analítica

A concentração dos analitos analisada pelos métodos propostos foi determinada mediante a relação linear de um sinal de intensidade fluorescente ( $y$ ) e a concentração conhecida de uma solução do analito ( $x$ ):  $y = mx + b$ . A diferença do cálculo da incerteza associada à preparação de soluções, em que cada componente é independente, os valores obtidos para coeficiente angular

(m) e linear (b) da relação linear entre o sinal fluorescente e a concentração do analito foram obtidos com o mesmo grupo de dados e, portanto, existe correlação ( $r_{m,b}$ ) entre ambos valores. Assim, o cálculo dessa fonte de incerteza foi estimado utilizando as equações Equações 12 a 18 (ISO, 1993).

$$u_{ca} = \sqrt{u_m^2 \times c_m^2 + u_b^2 \times c_b^2 + (2 \times u_m c_m \times u_b c_b \times r_{m,b})} \quad (12)$$

Onde  $u_m$  e  $u_b$  são as incertezas associadas ao coeficiente linear e angular,  $c_m$  e  $c_b$  são coeficientes de sensibilidade e  $r_{a,b}$  é a correlação entre os coeficientes a e b.

$$u_b^2 = \frac{s^2 \sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - \sum x_i^2} \quad (13) \quad u_m^2 = n \frac{s^2}{n \sum x_i^2 - \sum x_i^2} \quad (15)$$

$$r_{m,b} = -\frac{\sum x_i}{n \sum x_i^2} \quad (14) \quad s^2 = \frac{\sum (y_{obs} - y_{prev})^2}{n-2} \quad (16)$$

Onde  $n$  é o número de pontos na curva analítica,  $s^2$  é a média quadrática dos resíduos da curva obtidos pelo método dos mínimos quadrados (sinal observado – previsto),  $\sum x_i^2$  é o somatório dos quadrados das concentrações utilizadas nos pontos da curva, e  $(\sum x_i)^2$  é a somatória dos pontos da curva ao quadrado (ISO, 1993). Os coeficientes de sensibilidade, foram calculados utilizando o método das derivadas parciais da expressão  $x = (y-b)/m$ :

$$c_a = \frac{\partial x}{\partial a} = -\frac{1}{m} \quad (17) \quad c_b = \frac{\partial x}{\partial b} = \frac{b-y}{m^2} \quad (18)$$

Onde  $m$  e  $b$  são os coeficientes angular e linear, e  $y$  é o valor do sinal fluorescente ou área de pico observada em determinada concentração da faixa linear dos métodos.

### 3.6.2.3.

#### Incerteza associada à repetibilidade e precisão intermediária

O valor de  $u_{rp}$  foi calculado a partir dos resultados da repetibilidade, ou seja, a partir do desvio padrão obtido de um número determinado de medições da concentração do analito em réplicas autênticas ( $n \geq 5$ ); o cálculo indicado para uma incerteza Tipo A:  $u_{rp} = s/\sqrt{n}$ . O valor de  $u_{pi}$  foi calculado a partir dos dados da precisão intermediária, ou seja, a partir dos dados obtidos após realizar uma análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos sob condições diferentes de análise (INMETRO,2007).