

6

Resultados: Desenvolvimento de métodos para determinação indireta da vareniclina

A vareniclina (VRN), comercializada na forma de tartarato, é o princípio ativo de medicamentos para tratamento de hábitos tabágicos. Estudos com a derivatização fotoquímica da VRN foram realizados visando aumentar a fluorescência medida de suas soluções e, com isso, desenvolver método analítico utilizando a técnica de espectrofluorimetria e avaliar a potencial adaptação da abordagem para quantificar a VRN em medicamentos para o uso de HPLC com detecção por fluorescência.

6.1. Desenvolvimento do método espectrofluorimétrico para determinação de vareniclina após derivatização fotoquímica

6.1.1. Estudos preliminares e otimização das condições de derivatização fotoquímica

Dado que a vareniclina está presente na composição do medicamento como um sal (tartarato) altamente solúvel em água, este solvente foi utilizado para a preparação de padrões do analito e amostras de medicamento. Na Figura 52 é mostrado um espectro de absorção da VRN ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), onde os comprimentos de onda máximos encontrados foram 233 nm e uma faixa de 319 nm à 333 nm. Em cada um dos comprimentos de onda, os coeficientes de absorvidade molar encontrados foram, respectivamente, $3,4 \times 10^4$; $1,1 \times 10^4$ e $9,3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Apesar de ser uma molécula com alta rigidez estrutural e com conjugação de ligações duplas, a VRN não apresenta fluorescência nativa (Figura 52). A presença de átomos de nitrogênio na estrutura da VRN favorece a eficiência do cruzamento intersistemas³¹.

³¹ Conforme apontado por Suppan (1972), os elétrons dos átomos de nitrogênio não são conjugados com as insaturações do anel pirazínico, promovendo a falta da fluorescência do anel aromático nitrogenado ao ser comparada com a do benzeno.

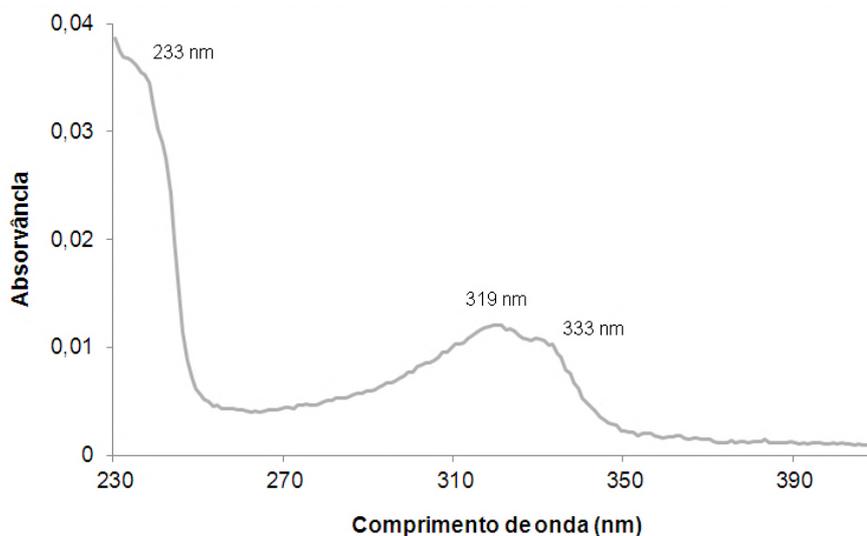


Figura 51 - Espectro de absorção molecular da VRN ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 100% água).

Assim, fluorescência de intensidade intermediária deveria ser esperada ao se considerar apenas a estrutura do anel benzênico combinada com o anel pirazínico (quinoxalina). O cruzamento intersistemas provocaria a retirada de parte da população excitada para o estado tripleto e, como a molécula se encontra em solução aquosa, a desativação radiativa do estado tripleto para o fundamental é pouco eficiente em relação aos processos não radiantes. No entanto, a ausência de fluorescência da VRN em solução deve ser principalmente relacionada ao anel de sete membros com uma cabeça de ponte. Nesse caso, a cabeça de ponte distorce a geometria da substância (reduzindo a planaridade) dificultando a sobreposição dos orbitais π e a deslocalização eletrônica do sistema.

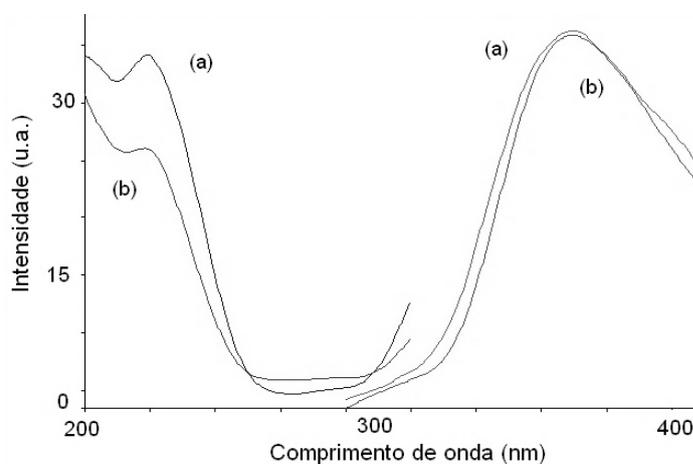


Figura 52 - Espectros de excitação e de emissão da (a) água ultrapura e (b) solução aquosa da VRN ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Processos de fotólise em meios aquosos podem provocar a quebra do anel de 7 membros, o que aumentaria a planaridade da estrutura e melhoraria a sobreposição de orbitais π . Dependendo das condições, o processo pode resultar em mais insaturações na estrutura da molécula, aumentando a chance de formação de produtos de reação fluorescentes e estáveis.

Com o propósito de induzir a fluorescência da vareniclina, testes foram realizados pela exposição ao UV de soluções de VRN ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em diferentes condições: solução aquosa ácida (HCl), solução aquosa básica (NaOH) e solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio. A escolha dos meios ácido e básico advém da melhoria da eficiência da fotólise e a formação de produtos altamente fluorescentes nessas condições (Huang et al, 2002; Lopez et al, 2005). A incorporação do peróxido de hidrogênio na solução irradiada foi testada com base em informações da literatura que apontam o uso de coadjuvantes oxigenados como H_2O_2 e acetona na formação de produtos altamente fluorescentes (Matawari et al, 2003; Chen e He, 2000). Os estudos de derivatização fotoquímica da VRN foram realizados com o reator fotoquímico II.

Para a realização desse estudo, um desenho experimental fatorial (2^3) foi usado para avaliar as três variáveis para derivatização da VRN: (i) meio da reação, (ii) tempo de exposição ao UV e (iii) presença de coadjuvante, conforme mostrado na Tabela 26.

Tabela 26 - Parâmetros e níveis escolhidos para o desenho experimental fatorial (2^3) da VRN após derivatização

| Parâmetro/ valores codificados | - | + |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Meio de reação | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ | NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| Tempo (min) | 10 | 20 |
| Presença de coadjuvante (H_2O_2) | 0 % | 1% |

Vale salientar que esse desenho experimental é de caráter exploratório e a escolha dos níveis das variáveis foi realizada com base nos resultados dos estudos para a derivatização da AMT e da TBZ e com base em informações da literatura. Em geral, nas condições de radiância do reator do laboratório, tempos de exposição ao UV entre 10 e 20 min são suficientes para indução de fluorescência caso a condição reacional seja apropriada. Meios aquosos ácidos ou básicos, em concentrações maiores que $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ são suficientes para

favorecer a reações fotoquímicas nos casos nos quais o ajuste do pH é um fator relevante. De acordo com informações extraídas da revisão bibliográfica (Chen et al., 2000; Matawari, 2003), quando coadjuvantes são utilizados para favorecer uma reação fotoquímica, concentrações menores ou iguais a 1% v/v são suficientes. Assim, 1% de H₂O₂ foi adicionado. Os resultados obtidos para a VRN (1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) segundo condições do desenho experimental estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultados do desenho experimental exploratório (2³) para avaliar o efeito do tempo de UV, meio de reação e presença de H₂O₂ na fluorescência da solução de VRN exposta ao UV

| # | UV (min) | Meio de reação/ concentração final | H ₂ O ₂ (%) | Intensidade (u.a.)* | $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm) |
|---|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 10 | HCl/0,01 mol L ⁻¹ | 0 | 48 | 233/340 |
| 2 | 10 | HCl/0,01 mol L ⁻¹ | 1 | 40 | 233/340 |
| 3 | 10 | NaOH/0,01 mol L ⁻¹ | 0 | 439 | 257/439 |
| 4 | 10 | NaOH/0,01 mol L ⁻¹ | 1 | 212 | 257/439 |
| 5 | 20 | HCl/0,01 mol L ⁻¹ | 0 | 85 | 233/340 |
| 6 | 20 | HCl/0,01 mol L ⁻¹ | 1 | 47 | 233/340 |
| 7 | 20 | NaOH/0,01 mol L ⁻¹ | 0 | 256 | 257/439 |
| 8 | 20 | NaOH/0,01 mol L ⁻¹ | 1 | 154 | 257/439 |

* Nas soluções 1,2,5 e 6 os comprimentos de onda e intensidades obtidas com as soluções de VRN foram as mesmas obtidas com o sinal do branco

Nesse estudo exploratório, não foi observada a indução de fluorescência da VRN em meio ácido. Por outro lado, em meio básico, a fluorescência da VRN foi observada com $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ em 257/439 nm. Outro par de bandas, com $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ em 353/409 nm, foi também observado após exposição da VRN ao UV em meio básico, porém, a fluorescência foi menos intensa (até 50% menor). Cabe ressaltar que não foi observada fluorescência das soluções de VRN diferente da medida nos respectivos brancos quando se modificou o pH do meio mas não se expôs as soluções à irradiação UV. Com relação à presença do peróxido de hidrogênio em meio básico, a fluorescência tendeu a ser menos intensa, em ambos os tempos de exposição ao UV, na presença desse coadjuvante. Nesta primeira avaliação de condições experimentais, o meio ácido não favoreceu a indução de fluorescência. No meio básico, a presença de H₂O₂ na solução de VRN produziu fluorescência de menor intensidade do que na ausência desse coadjuvante. Assim, os estudos de otimização prosseguiram com as seguintes variáveis experimentais: (i) tempo de exposição ao UV e (ii) concentração de NaOH no meio reacional.

6.1.2. Otimização das condições de fotoderivatização da VRN

O efeito da concentração de NaOH e do tempo de exposição ao UV foram avaliados primeiramente por meio de estudos univariados. Posteriormente, uma otimização multivariada foi realizada utilizando um desenho experimental para permitir a avaliação da importância do efeito de cada uma das variáveis experimentais e as possíveis interações entre estas. Considerando os resultados obtidos com os experimentos univariados para induzir fluorescência da TBZ e AMT, a concentração da VRN utilizada nesses estudos foi $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para evitar o uso de filtros de atenuação após induzir a fluorescência do analito. Inicialmente, o aumento da intensidade da fluorescência das soluções de VRN foi avaliado em função da variação da concentração de NaOH (na faixa entre 0 e $0,6 \text{ mol L}^{-1}$) presente no meio exposto ao UV por um tempo fixo de 20 min. Cada ponto experimental foi feito em triplicata, descontando de cada sinal o valor do respectivo branco. Como esperado, na solução de VRN na qual não foi adicionado NaOH, não foi observada fluorescência diferente da observada no respectivo branco. Na medida em que a concentração de NaOH foi elevada, a fluorescência da solução de VRN cresceu alcançando um patamar entre $0,4$ e $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 53).

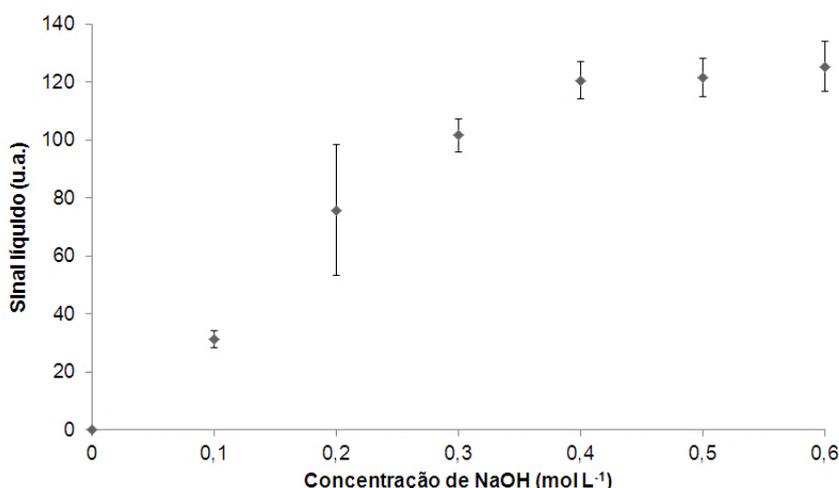


Figura 53 - Efeito da concentração de NaOH na fluorescência de soluções aquosas de VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas com UV por 20 min.

Experimentos realizados com soluções de VRN preparadas com soluções contendo concentrações de NaOH iguais ou superiores a $0,75 \text{ mol L}^{-1}$,

mostraram-se instáveis após exposição ao UV. Por exemplo, ao comparar a fluorescência medida, em intervalos de 5 min, de duas soluções de VRN, a primeira com concentração $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e a outra com $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (Figura 54), foi observada a queda sistemática de sinal para a solução mais concentrada, enquanto que na solução menos concentrada, a fluorescência é estável, principalmente nos primeiros 40 min. Após 40 min, uma leve queda de sinal foi observada ao longo dos 80 min seguintes. A partir desse resultado pode se inferir que o excesso de NaOH pode ser uma condição que provoque taxa de degradação dos fotoprodutos fluorescentes maior do que em concentrações menores da base.

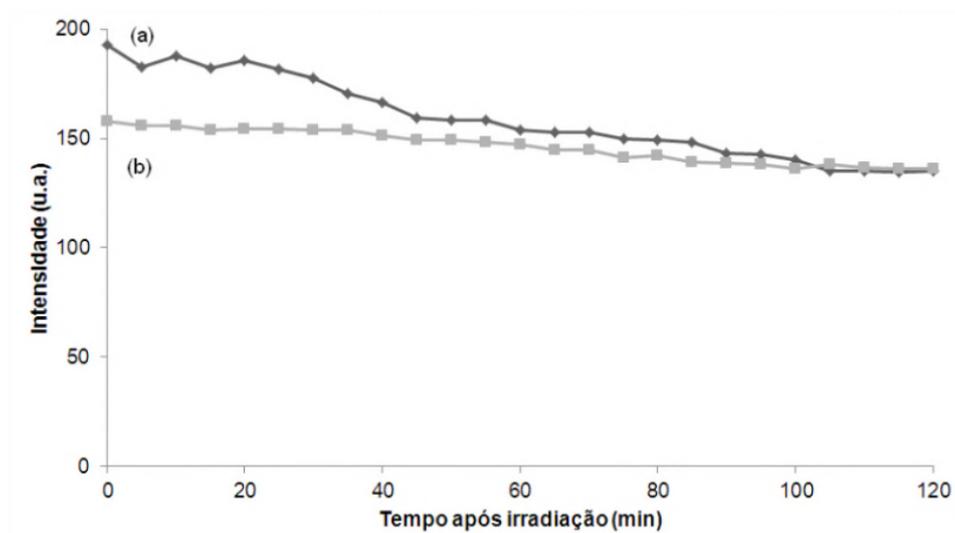


Figura 54 - Fluorescência da VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) monitorada sob irradiação descontínua, entre 0 e 120 min após derivatização fotoquímica (20 min UV) em NaOH (a) $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $0,60 \text{ mol L}^{-1}$.

O estudo da influência do tempo de exposição ao UV foi avaliado em soluções de VRN preparadas em solução aquosa de NaOH de $0,60 \text{ mol L}^{-1}$. Os tempos de exposição ao UV variaram de 0 e 40 min. O experimento foi realizado em triplicata e a fluorescência dos respectivos brancos também foi monitorada. Os resultados indicados na Figura 55 apontam para a maior fluorescência da solução de VRN com exposição ao UV na faixa entre 15 e 30 min. Tempos maiores de exposição ao UV indicaram a queda de fluorescência, corroborando a hipótese levantada de que o(s) fotoproduto(s) da VRN é(são) instável(is) em condições mais extremas das variáveis estudadas.

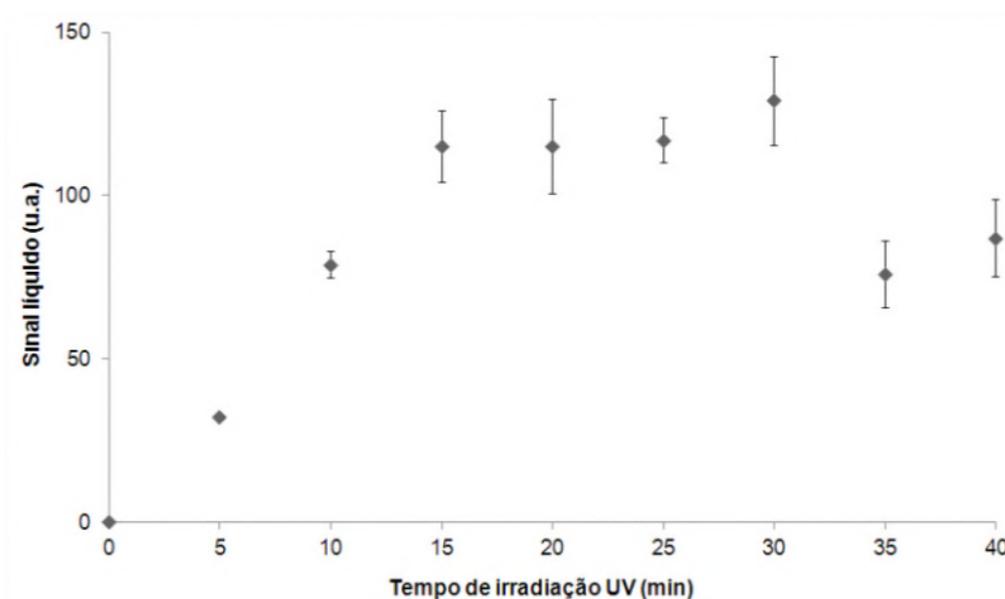


Figura 55 - Efeito do tempo de irradiação UV na fluorescência das soluções aquosas de VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em meio de NaOH $0,6 \text{ mol L}^{-1}$.

Para realizar o ajuste final das condições experimentais (tempo de irradiação UV e concentração final de NaOH) foi feito com um desenho experimental do tipo CCD. Os pontos experimentais utilizados no CCD estão indicados na Tabela 28. Para todas as soluções, a concentração de $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de VRN foi usada com experimentos em cinco réplicas realizados apenas no ponto central do planejamento.

Tabela 28 - Valores para os parâmetros do CCD na otimização das condições de derivatização fotoquímica da VRN

| Parâmetro/ valores codificados | $-\sqrt{2}$ | -1 | 0 | +1 | $+\sqrt{2}$ |
|--|-------------|------|------|------|-------------|
| Concentração de NaOH (mol L^{-1}) (C) | 0,03 | 0,40 | 0,60 | 1,00 | 1,17 |
| Tempo de irradiação (t) | 0 | 5 | 20 | 35 | 41 |

Os resultados obtidos dos experimentos realizados no planejamento CCD (fluorescência líquida) podem ser observados na Tabela 29. No caso das soluções de VRN preparadas em NaOH $1,00$ e $1,17 \text{ mol L}^{-1}$, a fluorescência, após a exposição ao UV, foi medida após estabilização do sinal fluorescente.

Tabela 29 - Resultados (intensidade de fluorescência) obtidos na otimização dos parâmetros de derivatização fotoquímica da VRN pelo CCD.

| No. | [NaOH] mol L ⁻¹ | Tempo irradiação UV, min | Sinal líquido* (u.a.) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,20 | 5 | 0 |
| 2 | 0,20 | 35 | 74 |
| 3 | 1,00 | 5 | 18 |
| 4 | 1,00 | 35 | 50 |
| 5 | 0,03 | 20 | 78 |
| 6 | 1,17 | 20 | 125 |
| 7 | 0,60 | 0 | 0 |
| 8 | 0,60 | 41 | 66 |
| 9 (ponto central) | 0,60 | 20 | 143; 135; 160; 146; 143 |

* Sinal líquido = Intensidade da VRN – Intensidade do ensaio do branco

Observa-se na Figura 56a, a superfície de resposta gerada a partir dos resultados da Tabela 29. O gráfico de Pareto na Figura 56b mostra a influência de cada fator testado em função do aumento da intensidade de fluorescência da solução de VRN. Observa-se que o tempo de exposição ao UV foi a variável mais relevante e que os componentes quadráticos de ambas as variáveis (tempo de exposição ao UV e concentração de NaOH) são importantes, o que resultou na curvatura em duas dimensões da superfície de resposta. O efeito da interação entre as variáveis foi irrelevante.

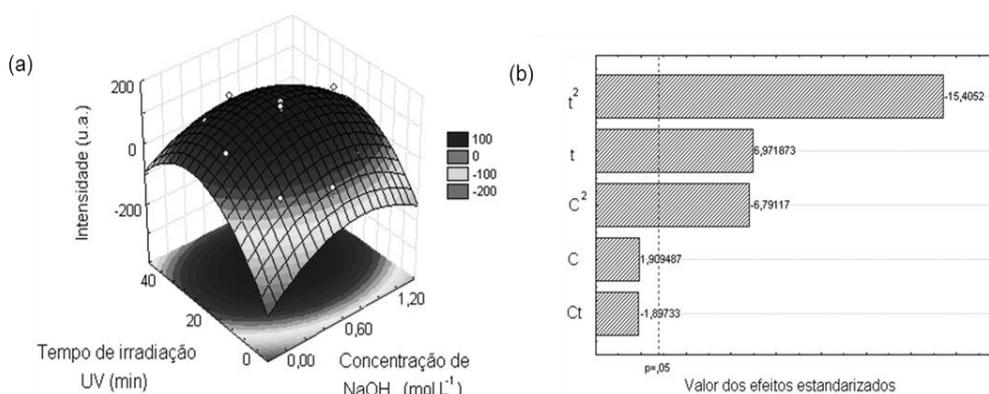


Figura 56 - Resultados do planejamento experimental (CCD) para a otimização das variáveis para derivatização fotoquímica da VRN (C = concentração de NaOH ; t = tempo de UV): (a) Superfície de resposta e (b) gráfico de Pareto.

O modelo matemático que descreve o comportamento do sinal analítico em função das variáveis é indicado na Equação 22. Ao resolver a equação por meio da resolução das derivadas parciais, os valores ótimos para o procedimento de derivatização fotoquímica para alcançar o maior incremento na intensidade de fluorescência da solução da VRN foram: (i) concentração de

NaOH de 0,64 mol L⁻¹ no meio de reação e (ii) tempo de irradiação UV de 23 min.

$$I = 14,92C - 54,75C^2 - 55,47t - 135,67t^2 - 20,97 Ct; R^2 = 0,94 \quad (22)$$

Onde *I* = intensidade do sinal; *C* = concentração de NaOH; e *t* = tempo de irradiação UV

Para verificar se o modelo apresentado na Equação 22 explica os resultados obtidos na otimização das variáveis experimentais, a análise de variância (ANOVA) dos dados foi realizada (Tabela 30). A análise não evidenciou falta de ajuste significativo do modelo (F calculado < F tabelado; valor p > 0,05), o que explica até 99% dos dados.

Tabela 30 - Análise de variância dos resultados do planejamento CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica da VRN.

| | SQ | GL | MQ | F | P |
|---------------------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| C | 445,40 | 1 | 445,40 | 3,6461 | 0,128822 |
| C ² | 5633,81 | 1 | 5633,81 | 46,1200 | 0,002455 |
| T | 5937,62 | 1 | 5937,62 | 48,6070 | 0,002225 |
| T ² | 28990,08 | 1 | 28990,08 | 237,3211 | 0,000104 |
| Ct | 439,74 | 1 | 439,74 | 3,5998 | 0,130641 |
| Falta de ajuste | 2125,28 | 3 | 708,43 | 5,7994 | 0,061282 |
| Erro puro | 488,62 | 4 | 122,16 | | |
| Total SQ | 40457,04 | 12 | | | |
| % variância explicada | 94% | | | | |
| % máximo de variância explicada | 99% | | | | |

SQ = soma quadrática dos resíduos; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática dos resíduos (SQ/gl); F = Valor de F calculado para cada variável; P = valor p calculado para cada variável (95% de confiança). % máximo de variância = (SQ_{TOTAL} - SQ_{ERRO PURO}) / SQ_{TOTAL} X 100%

Um resumo dos parâmetros experimentais para derivatização fotoquímica da VRN e dos parâmetros instrumentais utilizados para a determinação indireta da VRN é apresentado na Tabela 31. Essas condições foram utilizadas para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito e para analisar amostras de medicamentos.

Tabela 31 - Condições para a determinação indireta da VRN por espectrofluorimetria pela abordagem de derivatização fotoquímica.

| Parâmetro | Valor utilizado |
|--|-------------------------------|
| Meio de reação | NaOH 0,64 mol L ⁻¹ |
| Tempo de irradiação UV | 23 min |
| Par de comprimentos de onda de excitação/emissão | 247/380 nm |
| Velocidade de varredura | 1500 nm min ⁻¹ |
| Bandas espectrais de passagem | 15 nm |

Na Figura 57 se podem observar os espectros de excitação e de emissão medidos da solução de VRN antes e após a derivatização fotoquímica nas condições da Tabela 31. Observa-se que houve indução de fluorescência de uma solução inicialmente não fluorescente e que, comparada ao branco do experimento, tem intensidade três vezes maior quando a concentração de VRN foi $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

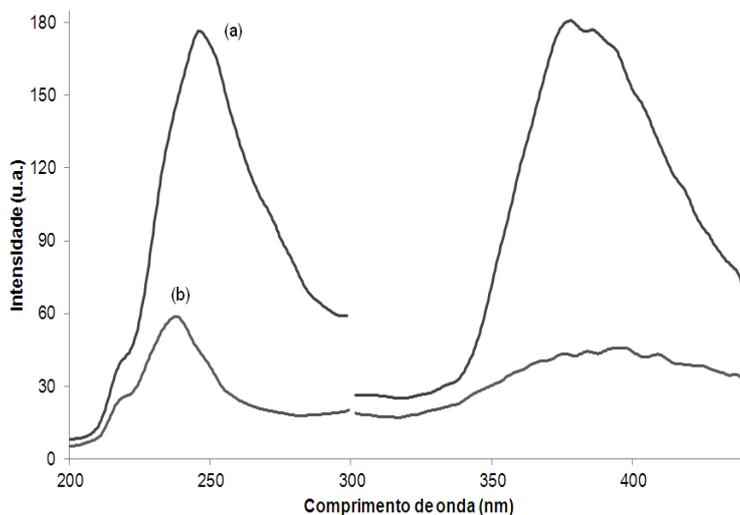


Figura 57 - Espectros de excitação e de emissão da VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) (a) após e (b) antes da derivatização fotoquímica (NaOH $0,64 \text{ mol L}^{-1}$; 23 min UV).

6.1.3.

Estudo de estabilidade de fluorescência do(s) fotoderivado(s) e proposta de mecanismo de fotoderivatização

Após a otimização das variáveis da derivatização fotoquímica da VRN e visando a sua determinação por espectrofluorimetria, a estabilidade do(s) fotoproduto(s) formado(s) foi avaliada pelo monitoramento da fluorescência da solução após os 23 min de exposição ao UV. As medições foram feitas a cada 5 min após o processo de derivatização fotoquímica até o tempo máximo de 90 min (Figura 58). Foi verificado que o sinal medido foi estável ao longo do experimento e que após 1 dia de repouso, sob refrigeração e ao abrigo da luz, o sinal obtido ainda permaneceu estável e equivalente ao medido no dia anterior (variação aleatória de sinal menos que 5%).

Com o intuito de verificar se a fluorescência do fotoderivado é afetada pelo tempo de irradiação da lâmpada de xenônio do equipamento, foi avaliada a

variação de fluorescência da solução de VRN $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ antes e após a aplicação do procedimento de fotoderivatização. Nesse experimento, as soluções foram expostas continuamente e por 30 min à luz UV de excitação no compartimento de amostra do instrumento.

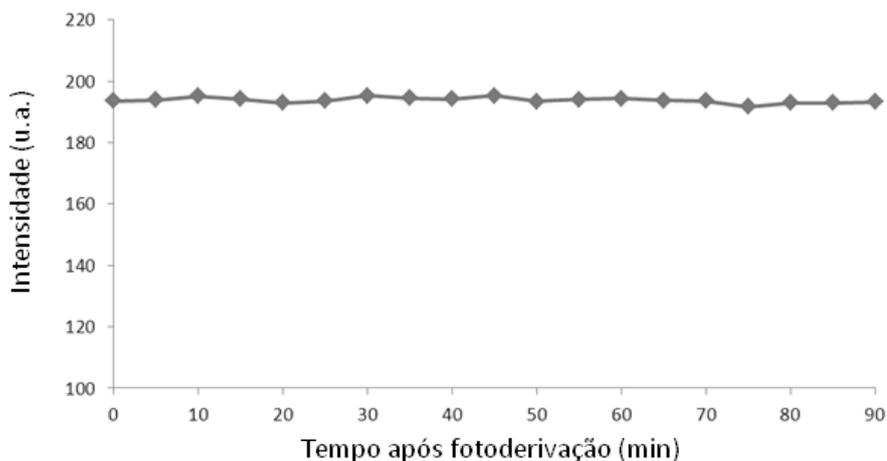


Figura 58 - Avaliação da estabilidade da fluorescência VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em condições otimizadas de derivatização ($\text{NaOH } 0,64 \text{ mol L}^{-1}$; 23 min UV), medida sob irradiação descontínua, em intervalos de 5 min após reação fotoquímica.

Observa-se na Figura 59 que ambas as soluções produzem sinal estável ao longo do tempo. Tal resultado comprova a estabilidade da solução de VRN após o procedimento de fotoderivatização, além de indicar que, nas condições de medição de sinal, a VRN na solução original não é modificada a ponto de gerar o(s) fotoderivado(s) fluorescente(s).

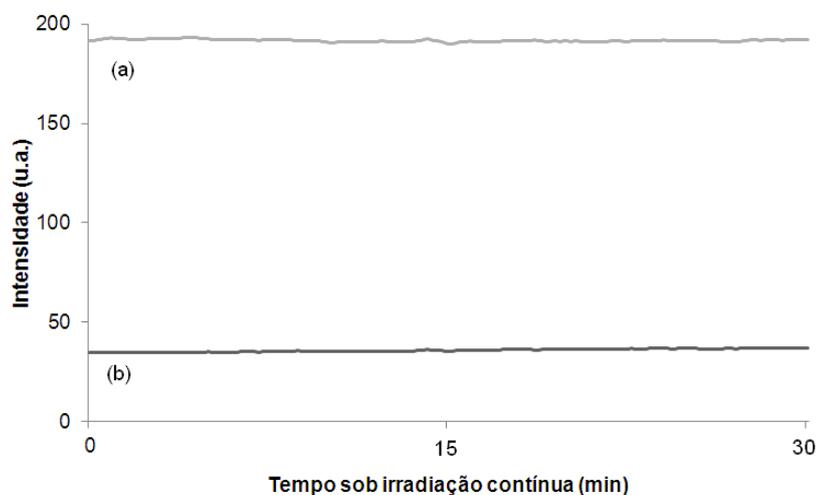


Figura 59 - Avaliação da estabilidade sob irradiação incidente contínua: a) fotoderivado ($\text{VRN } 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $0,64 \text{ mol L}^{-1}$, 23 min UV) e b) VRN ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

Para propor um mecanismo de reação fotoquímica da VRN para formar produto(s) fluorescentes e estáveis foram usados dados da literatura sobre os mecanismos de reações fotoquímicas de substâncias similares. A fotodissociação do grupo pirazina foi estudada sob condições extremas de alto vácuo e alta potência de irradiação com laser a 247 e 308 nm (Chesko et al., 1995; laser a 266 e 247 nm, Sevy et al, 2000). Em ambos os casos, foi detectada a degradação do grupo formando HCN. Mesmo que as condições de reação utilizadas para a derivatização fotoquímica neste trabalho sejam mais brandas, foi realizado um teste colorimétrico com sulfato ferroso 5% de modo a se tentar verificar a formação de HCN em solução. Como aparentemente não houve formação de ferrocianeto (com coloração característica azul) esse tipo de degradação foi descartada.

A indução de fluorescência da solução de VRN é decorrente da formação de produto(s) com maior eficiência quântica fluorescente, Isso pode ser decorrente do aumento da rigidez estrutural da molécula. No entanto, a VRN já tem uma estrutura bastante rígida com a ponte dos ciclos de 5 e 7 carbonos, em semelhança com o grupo norbornano. O mais plausível é que a quebra do grupo ciclo de 7 membros tenha produzido uma situação de planaridade que permitiu melhor deslocalização eletrônica no sistema como um todo. Dado que a fonte de irradiação não é forte o suficiente para quebra de ligações nos anéis aromáticos, presume-se que ocorreu uma reação de fotólise no anel de 7 membros. Essa fotólise provocaria a formação de um grupo de 5 carbonos com uma dupla ligação conjugada e planar ao sistema aromático da molécula. A fotólise de ligações –C-N- tem sido reportada para antibióticos fluoroquinolônicos (ciprofloxacina e norfloxacina; Mansilla et al, 2005) com uma fonte de irradiação de baixa pressão (lâmpadas de mercúrio, com emissão máxima em 254 nm) similares as utilizadas neste trabalho. Dessa forma, a formação de produtos fluorescentes a partir da VRN, após a derivatização fotoquímica, podem ter sido obtido a partir das propostas indicadas na Figura 60.

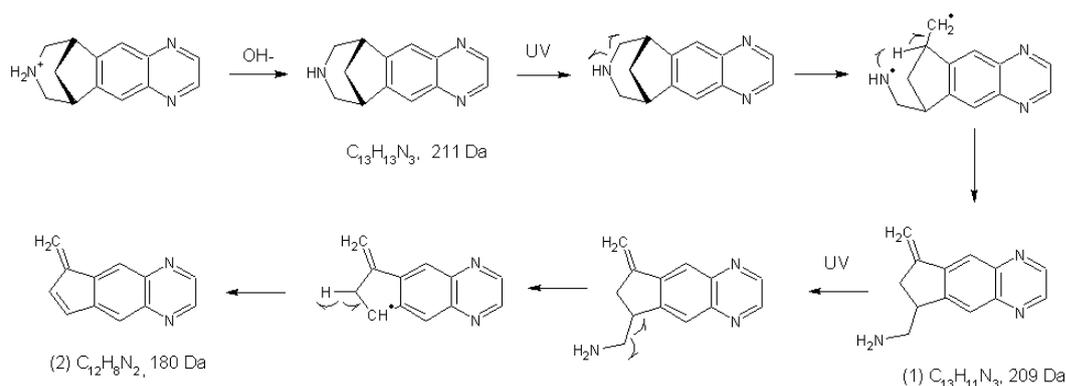


Figura 60 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da VRN em meio básico (solução a $0,64 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH exposta ao UV por 23 min) e formação de fotoprodutos fluorescentes.

6.1.4. Parâmetros analíticos de mérito

A relação entre a intensidade de fluorescência produzida após a derivatização fotoquímica da VRN e a concentração deste analito (na faixa entre $5,0 \times 10^{-8}$ e $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi estudada (Figura 61). Para cada ponto da curva analítica foram realizadas três réplicas.

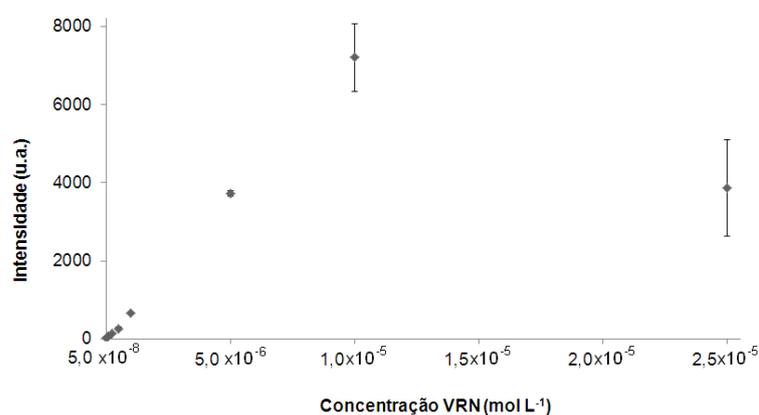


Figura 61 - Relação entre a concentração da VRN (faixa entre $5,0 \times 10^{-8}$ e $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a fluorescência medida após derivatização fotoquímica na condição otimizada (23 min UV; $0,638 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH).

O comportamento linear da curva foi observado até a concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de VRN, isto é, três ordens de magnitude. Porém, para evitar o uso

de múltiplos filtros de atenuação de sinal ao longo do processo de construção da curva, decidiu-se por limitar a faixa de trabalho da curva até a concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 62).

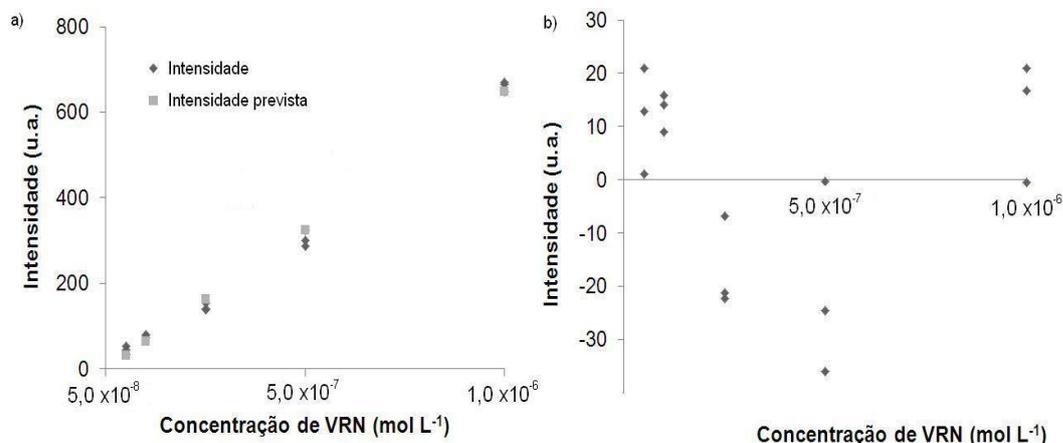


Figura 62 - (a) Faixa linear do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica ($\text{NaOH } 0,638 \text{ mol L}^{-1}$ e 23 min UV) e (b) respectivo gráfico de resíduos.

Após análise de regressão dos dados, a equação da curva obtida (Figura 62) foi $Y = 6,5 \times 10^8 (\pm 1,4 \times 10^7)X - 0,8 (\pm 7,3)$, onde Y é a intensidade do sinal analítico, expresso em unidades arbitrárias (u.a.), e X é a concentração da VRN, em mol L^{-1} . O coeficiente de determinação da curva foi de 0,994. Apesar do gráfico dos resíduos ter mostrado aparentemente uma tendência a um comportamento quadrático, a magnitude dispersão dos resíduos não foi tendenciosa, indicando um sistema homocedástico. O comportamento linear foi comprovado por meio de um teste estatístico t-Student para cada um dos resíduos dos pontos experimentais, (t calculado $<$ t crítico $_{u=1, 95\%, \text{unilateral}} = 6,314$). Por outro lado, a análise de regressão mostrada no Anexo D, embora mostrou um leve achatamento da distribuição, apontou um gráfico de resíduos padronizados não tendencioso e que os dados pertencem a uma distribuição normal³². Os valores de LD e de LQ foram calculados pelo critério de $3s_b/m$ e $10s_b/m$, onde s_b é o desvio padrão de 10 medições do ensaio em branco e m é a inclinação da curva. Os resultados obtidos foram $1,5 \times 10^{-8}$ e $5,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

³² O achatamento da distribuição é apontado pelo parâmetro de assimetria (Anexo C), cujo valor calculado foi de -0,6, e a distribuição normal dos dados foi apontada pelo teste de Jarque-Bera (valor calculado = 1,41 $<$ valor crítico = 5,9).

A repetibilidade do método foi estimada para três concentrações dentro da faixa linear do método ($n = 5$) e expressa como coeficiente de variação (CV%), como mostrado na Tabela 32. Para a precisão intermediária, após uma análise de variância, constatou-se que os resultados obtidos, para um nível de 95% de confiança, não foram significativamente diferentes ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$). Para a menor concentração testada, a precisão intermediária foi de 22%, enquanto que para as demais concentrações, tanto a precisão intermediária como a repetibilidade tiveram valores para CV menores que 7%.

Tabela 32 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica na condição otimizada.

| | Concentração testada (mol L^{-1}) | | |
|--------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| | $5,0 \times 10^{-8}$ | $5,0 \times 10^{-7}$ | $1,0 \times 10^{-6}$ |
| Repetibilidade (CV, %) | 15 | 4 | 2 |
| Precisão intermediária (CV, %) | 22 | 7 | 4 |
| $F_{\text{calculado}}^*$ | 2,03 | 3,69 | 1,48 |

* $F_{\text{crítico}} (u/u = 4/2) = 3,88$

A estimativa da incerteza de medição foi realizada para as três concentrações dentro da faixa linear do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica, considerando as quatro fontes principais de incerteza: (i) a preparação de soluções, (ii) os parâmetros da curva analítica; (iii) a repetibilidade e (iv) a precisão intermediária. Os resultados obtidos para a estimativa das incertezas de medição para as três concentrações de VRN se encontram na Tabela 33.

Tabela 33 - Valores estimados para cada uma das fontes de incerteza de medição associados ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica.

| Fonte de incerteza | Concentração testada (mol L^{-1}) | | |
|---|---|----------------------|----------------------|
| | $5,0 \times 10^{-8}$ | $5,0 \times 10^{-7}$ | $1,0 \times 10^{-6}$ |
| | Valor da incerteza estimada (mol L^{-1}) | | |
| Repetibilidade | $7,6 \times 10^{-9}$ | $2,4 \times 10^{-8}$ | $1,8 \times 10^{-8}$ |
| Precisão intermediária | $1,1 \times 10^{-8}$ | $4,8 \times 10^{-8}$ | $3,6 \times 10^{-8}$ |
| Preparação de soluções | $7,7 \times 10^{-10}$ | $7,8 \times 10^{-9}$ | $1,5 \times 10^{-8}$ |
| Curva analítica | $1,2 \times 10^{-8}$ | $3,2 \times 10^{-8}$ | $3,2 \times 10^{-8}$ |
| Incerteza combinada | $2,1 \times 10^{-8}$ | $6,5 \times 10^{-8}$ | $8,1 \times 10^{-8}$ |
| Incerteza combinada (%) | 36% | 11% | 5% |
| Incerteza expandida ($U_{k=2,048; 95\%}$) | $4,3 \times 10^{-8}$ | $1,3 \times 10^{-7}$ | $1,6 \times 10^{-7}$ |

Como pode ser observado na Tabela 33, o valor de incerteza associada à preparação de soluções não contribui significativamente no valor da incerteza combinada, nas três concentrações estudadas. Tal fato pode ser visualizado na Figura 63, na qual os valores de cada fonte de incerteza da Tabela 33 são reportados em termos de contribuição percentual do valor da incerteza combinada para cada concentração. Para a incerteza associada à preparação de soluções, dependente da variabilidade da balança analítica e equipamento volumétrico, os valores estimados não ultrapassam 5% do valor nominal da concentração avaliada. Outra fonte que não contribuiu consideravelmente nas concentrações dentro da faixa linear à incerteza combinada foi a incerteza associada à repetibilidade, calculada a partir dos desvios-padrão obtidos para cada concentração no mesmo dia de análise. Já as incertezas associadas à precisão intermediária e a curva analítica tiveram maior influência no valor estimado da incerteza combinada em todas as concentrações. Particularmente, para a incerteza estimada na concentração do LQ, a precisão intermediária, que é afetada principalmente pela variação do reator fotoquímico em diferentes dias, a curva analítica (inclusive ao fazer um cálculo específico para essa concentração) e a repetibilidade afetaram conjuntamente ao valor da incerteza combinada. O valor de até 36% da incerteza de medição nessa concentração é mais susceptível à variabilidade da reação fotoquímica e principalmente da irradiação dentro do reator.

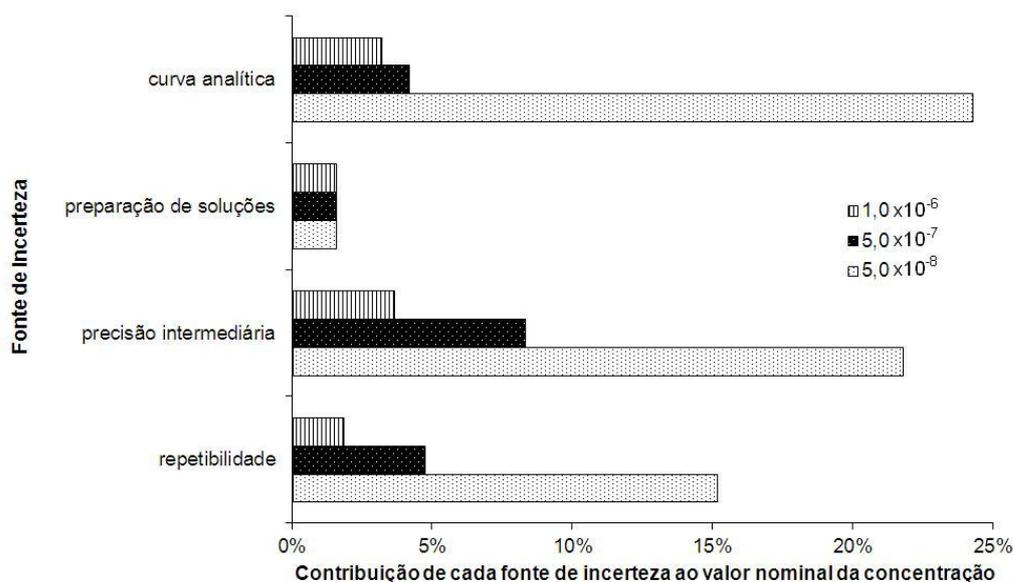


Figura 63 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica, em três níveis de concentração.

6.1.5. Aplicação do método para análise de VRN em medicamentos

O método espectrofluorimétrico desenvolvido foi aplicado para a determinação indireta da VRN no medicamento Champix®. Cada comprimido do medicamento possui 1,0 mg do princípio ativo. A derivatização fotoquímica foi realizada para a determinação VRN em três concentrações diferentes dentro da faixa linear do método. Análises por espectrofotometria de absorção na região do UV, utilizando um método da literatura (Koçak et al., 2013), foram realizadas nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A comparação dos resultados das análises utilizando outro método não foi realizada nas determinações de VRN de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ já que este não foi sensível o suficiente para detectar o analito nesse nível de concentração. Os resultados das análises, expressos como valores percentuais de recuperação (em relação ao valor nominal do analito indicada na bula do medicamento) estão na Tabela 34. Observa-se que não houve uma diferença significativa entre os resultados alcançados pelo método espectrofluorimétrico proposto e pelo de referência para um nível de 95% de confiança (teste t).

Tabela 34 - Recuperação em medicamento usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica.

| | Concentração de VRN (mol L ⁻¹) | | | | |
|---------------------------------|--|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | 5,0 x 10 ⁻⁸ | 5,0 x 10 ⁻⁷ | | 1,0 x 10 ⁻⁶ | |
| | Método proposto | Método proposto | Método de comparação | Método proposto | Método de comparação |
| Recuperação, % | 97 ± 9 | 94 ± 4 | 87 ± 13 | 96 ± 5 | 91 ± 5 |
| mg de VRN por comprimido | 0,96 ± 0,09 | 0,94 ± 0,04 | 0,87 ± 0,13 | 0,96 ± 0,05 | 0,91 ± 0,05 |
| Teste t* (variâncias desiguais) | --- | 1,0 | | 1,1 | |

*t_{crítico (v = 2)} = 4,141

6.2. Desenvolvimento de método cromatográfico para determinar VRN

6.2.1. Adaptação da derivatização fotoquímica para condições de cromatografia líquida para a determinação indireta da VRN

Para adaptar a abordagem da derivatização fotoquímica da VRN para a cromatografia líquida (HPLC) com detecção de fluorescência foi necessário

adaptar o meio reacional, para se ter uma solução de amostra menos corrosiva para a injeção e ajustar as condições cromatográficas para separação do analito.

Como a exposição da VRN à irradiação UV produz produtos fluorescentes somente em meio alcalino, sendo mais eficiente em concentrações relativamente elevadas de NaOH, resolveu-se sacrificar sinal analítico ao se trabalhar em condições mais brandas (solução aquosa de NaOH 0,01 mol L⁻¹ ou tampão borato de pH 10) para preservar a fase estacionária da coluna de separação.

Estudos de derivatização fotoquímica da VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram realizados com a exposição ao UV (até 30 min) de soluções do analito preparados em tampão borato pH 10 ou em (ii) NaOH, ambos na concentração de 0,01 mol L⁻¹. Nessas condições, dois pares de bandas foram observados, um mais intenso em 257/439 nm e outro menos intenso em 353/409 nm (Figura 64). O aparecimento do par de bandas com $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ em 257/439 nm corrobora os resultados dos estudos preliminares indicados no início do capítulo.

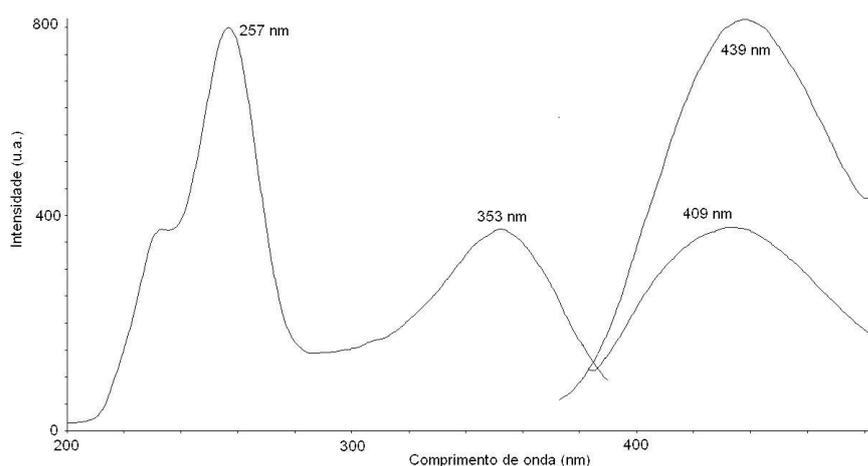


Figura 64 - Espectros de excitação e de emissão do fotoderivado da VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) irradiada por 10 min em meio de tampão borato pH 10 0,01 mol L⁻¹.

O perfil de crescimento desse par de bandas em função da exposição ao UV é indicado na Figura 65, sendo similar tanto em solução de NaOH quanto em solução de tampão borato pH 10. Observa-se que um sinal máximo é obtido com 10 min de irradiação com o UV. O outro par de bandas (353/409 nm) é menos intenso e não coincide com o par observado nos experimentos de derivatização fotoquímica em condições mais extremas de alcalinidade. A variação de intensidade desse par de bandas em função do tempo de exposição ao UV foi pouco relevante na faixa de tempo testada.

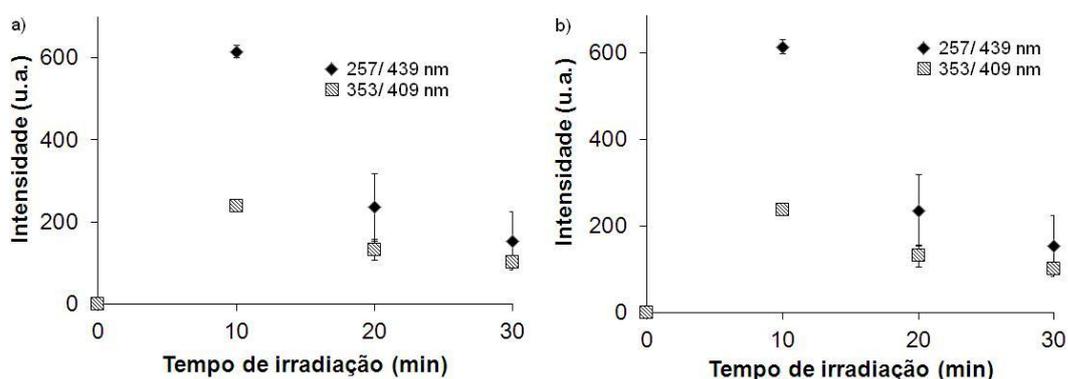


Figura 65 - Fluorescência de soluções de VRN ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas em meio de (a) NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) tampão borato pH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10.

A escolha das condições de separação cromatográfica foi feita baseando-se nas condições observadas na fotoderivação. Escolheu-se uma coluna com fase estacionária RP-C18 (XTerra®) compatível com pH básico. A fase móvel contendo tampão borato foi usada visando ter a mesma composição da solução de injeção da amostra e o monitoramento dos comprimentos de onda no detector de fluorescência foi baseado nos resultados obtidos em que se obteve maior sinal analítico nos testes por espectrofluorimetria (257/439 nm).

Os primeiros testes de injeção no cromatógrafo ($50 \mu\text{L}$) utilizando uma fase móvel de metanol/ tampão borato (pH 10; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) 20/80% v/v indicaram a presença de espécies fluorescentes, mas que foram eluídas no volume morto da separação. A fim de ajustar uma condição para promover melhor interação entre o(s) fotoderivado(s) e a fase estacionária, estudou-se o efeito da composição da fase móvel usando proporções de metanol/ tampão borato (pH 10; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) de 30/70% até 50/50% v/v. Com fase móvel na proporção de 30:70 v/v de metanol/tampão, as espécies luminescentes ainda não interagiram significativamente com a fase estacionária, eluindo no volume morto. Ao diminuir ainda mais a proporção de metanol a retenção foi mais eficiente conforme mostrado nos cromatogramas da Figura 66. Ao utilizar uma proporção de 50:50 de fase móvel, embora tenha havido uma leve diminuição da altura do pico, a assimetria do pico³³ diminuiu e o tempo de retenção aumentou, fazendo desta

³³ Assimetrias dos picos: 1,3, 1,3 e 1,2, para as proporções de 40:60; 45:55 e 50:50 v/v de fase móvel

proporção de fase móvel mais adequada para a separação cromatográfica da VRN, proporção que foi escolhida para efetuar o resto das separações.

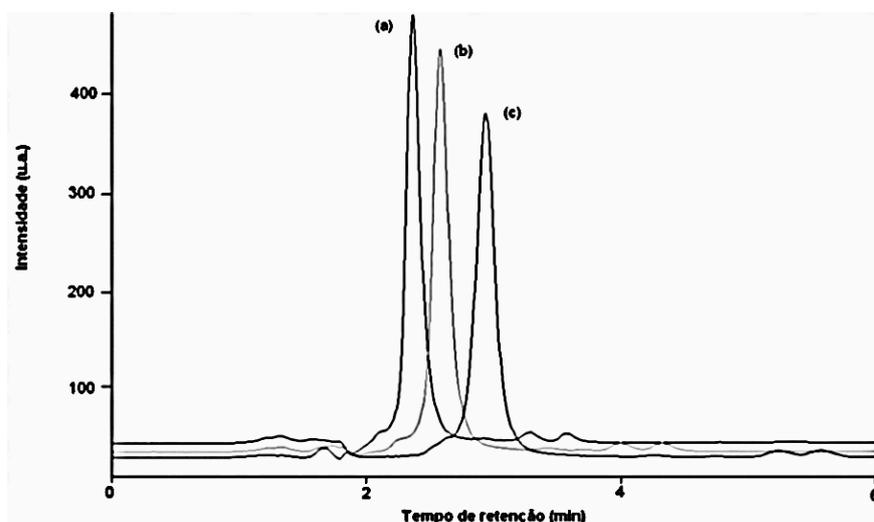


Figura 66 - Cromatogramas obtidos após fotoderivatização da VRN ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; tampão borato pH 10; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 10 min UV) com eluição isocrática e fase móvel de metanol/tampão borato (pH 10 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) nas proporções: (a) 40:60, (b) 45:55 e (c) 50:50 v/v; e detecção fluorimétrica em 257/ 439 nm.

Nas condições anteriormente mencionadas, a área de pico do analito foi monitorada em soluções de VRN ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; tampão borato pH 10) submetidas a diferente tempo de exposição à irradiação UV (0 – 30 min). Pelo observado nos resultados da Figura 67, foi confirmado que o tempo de 10 min, encontrado nos experimentos preliminares por espectrofluorimetria, produz o melhor resultado em termos de sinal analítico nas condições de brandas de fotoderivatização da VRN.

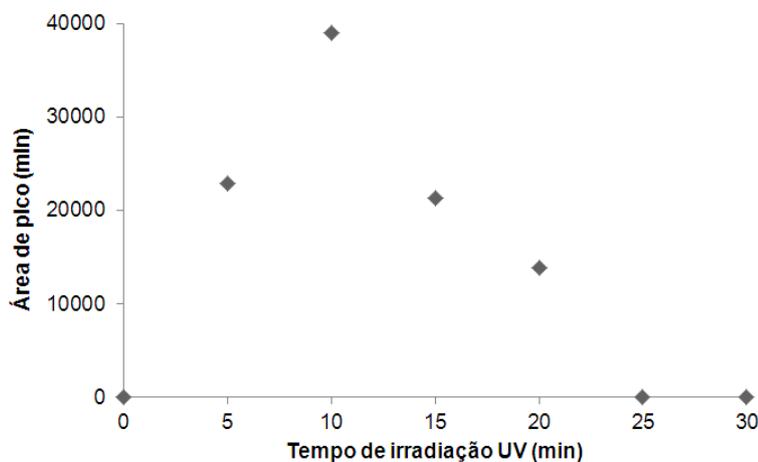


Figura 67 - Área de pico do fotoderivado (VRN $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, tampão borato pH 10 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de exposição ao UV.

Após avaliar o meio de reação adequado para a cromatografia, o comprimento de onda de detecção, a proporção de fase móvel para a separação do analito e o tempo de irradiação mais adequado para a fotoderivatização do analito, foram escolhidas condições de reação e determinação por HPLC que permitiram acoplar a abordagem fotoquímica à técnica cromatográfica. Um resumo dessas condições se encontra na Tabela 35.

Tabela 35 - Resumo das condições escolhidas para a determinação cromatográfica da VRN após fotoderivatização.

| Descrição | Parâmetro experimental |
|---------------------------|---|
| Meio de reação | Tampão borato (pH 10; 0,01 mol L ⁻¹) |
| Tempo de irradiação UV | 10 min |
| Fase móvel | Tampão borato 0,01 mol L ⁻¹ pH 10/ metanol 50:50 (v/v) |
| Vazão | 1 mL min ⁻¹ |
| Temperatura | Não controlada (ambiente) |
| Volume de injeção | 50 µL |
| Tempo de retenção | 2,97 min |
| Deteção por fluorescência | 257/439 nm |

Essas condições foram utilizadas nas etapas de obtenção dos parâmetros analíticos de mérito do método cromatográfico desenvolvido e para a aplicação do método para determinar VRN em medicamentos. Um cromatograma da VRN e do branco, obtidos após a derivatização nas condições de reação e separação indicadas na Tabela se mostram na Figura 68.

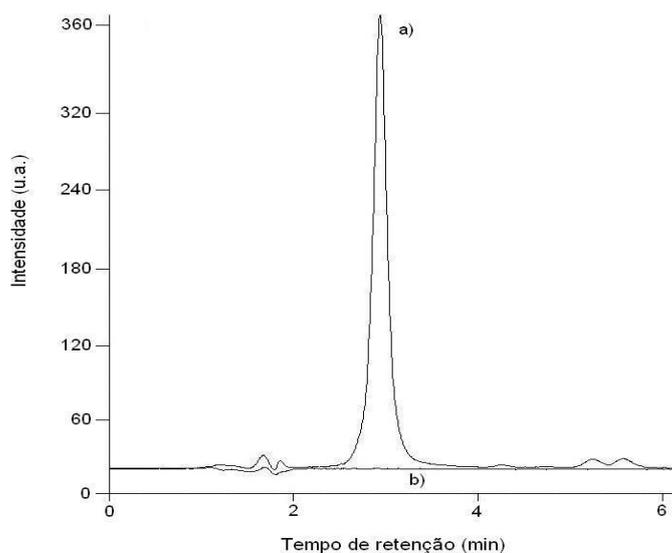


Figura 68 - Cromatogramas após fotoderivação em condições otimizadas: a) VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e b) ensaio do branco

6.2.2. Parâmetros analíticos de mérito

Nas condições escolhidas para a determinação indireta de VRN no HPLC a curva analítica produzida na faixa de concentrações de analito entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ se comportou de forma linear (Figura 69). A equação da curva foi $Y = 7,1 \times 10^{11} (\pm 1,6 \times 10^{10})X - 3,9 \times 10^5 (\pm 7,9 \times 10^4)$ com o valor de R² de 0,993. De acordo com o gráfico da Figura 69b, verifica-se um comportamento não tendencioso dos resíduos, confirmando o comportamento homeocedástico e linear. A análise de regressão dos dados mostrada no Anexo D, também não apontou para um comportamento tendencioso dos dados, que tem uma distribuição normal.

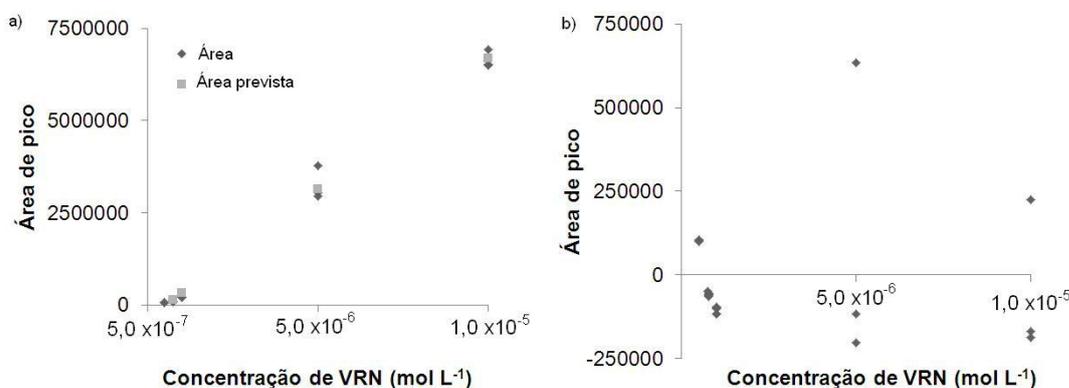


Figura 69 - (a) Curva analítica obtida por HPLC para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica e (b) respectivo gráfico de resíduos.

Os valores de LD e de LQ do método foram determinados utilizando respectivamente os critérios de $x + 3s_b$, e $x + 10s_b$, onde x é a média da menor concentração detectável e s_b é o desvio padrão de 10 medições dessa concentração. O valor de LD calculado foi de $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e para o LQ foi de $2,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de VRN.

Da mesma forma que com os outros trabalhos desenvolvidos nesta tese de doutorado, a repetibilidade foi determinada para três concentrações diferentes dentro da faixa linear do método, neste caso sendo $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O valor foi estimado coeficiente de variação de seis medições de soluções do padrão realizadas no mesmo dia de análise para cada concentração. Já a precisão intermediária foi estimada ao comparar resultados de dois dias diferentes de análise nas mesmas concentrações. Os resultados da

precisão intermediária e repetibilidade (na forma de coeficiente de variação) são resumidos na Tabela 36. Após uma análise de variância, foi observado que os valores de concentração para os dois dias de análise não foram significativamente diferentes (F calculado $<$ F crítico).

Tabela 36 - Repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica

| Concentração nominal (mol L ⁻¹) | 5,0 x10 ⁻⁷ | 5,0 x10 ⁻⁶ | 1,0 x10 ⁻⁵ |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Repetibilidade | 1,7 % | 2,7 % | 3,4 % |
| Precisão intermediária | 5,3 % | 5,6 % | 5,3 % |
| F calculado | 1,67 | 0,87 | 2,88 |

F crítico (*graus de liberdade* (u/u) = 10/1) = 4,96

A incerteza de medição do método foi calculada considerando como fontes principais as incertezas relacionadas à repetibilidade, precisão intermediária, a curva analítica e a preparação de soluções. Os cálculos e equações utilizados para estimar cada fonte de incerteza foram descritos no Capítulo 3. Os resultados para a estimativa de cada fonte de incerteza, da incerteza combinada e expandida para as três concentrações dentro da faixa linear do método desenvolvido se encontram descritos na Tabela 37.

Tabela 37 - Estimativa da incerteza de medição do método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica.

| Concentração nominal (mol L ⁻¹) | 5,0 x10 ⁻⁷ | 5,0 x10 ⁻⁶ | 1,0 x10 ⁻⁵ |
|---|--|-----------------------|-----------------------|
| Fonte de incerteza | Valor da fonte de incerteza (mol L ⁻¹) | | |
| Repetibilidade | 8,5 x10 ⁻⁹ | 1,4 x10 ⁻⁷ | 1,2 x10 ⁻⁷ |
| Precisão intermediária | 2,7 x10 ⁻⁸ | 2,8 x10 ⁻⁷ | 5,3 x10 ⁻⁷ |
| Preparação de soluções | 7,1 x10 ⁻⁹ | 7,1 x10 ⁻⁸ | 1,4 x10 ⁻⁷ |
| Curva analítica | 1,0 x10 ⁻⁷ | 2,9 x10 ⁻⁷ | 2,9 x10 ⁻⁷ |
| Incerteza Combinada | 1,1 x10 ⁻⁷ | 4,3 x10 ⁻⁷ | 6,3 x10 ⁻⁷ |
| Incerteza combinada, (%) do valor nominal da concentração | 20 % | 9% | 6% |
| U expandida ($k = 2,11$; 95%) | 2,3 x10 ⁻⁷ | 9,1 x10 ⁻⁷ | 1,3 x10 ⁻⁶ |

Os valores descritos na tabela anterior são apresentados como porcentagem na contribuição de cada fonte de incerteza em relação ao valor da incerteza combinada (Figura 70).

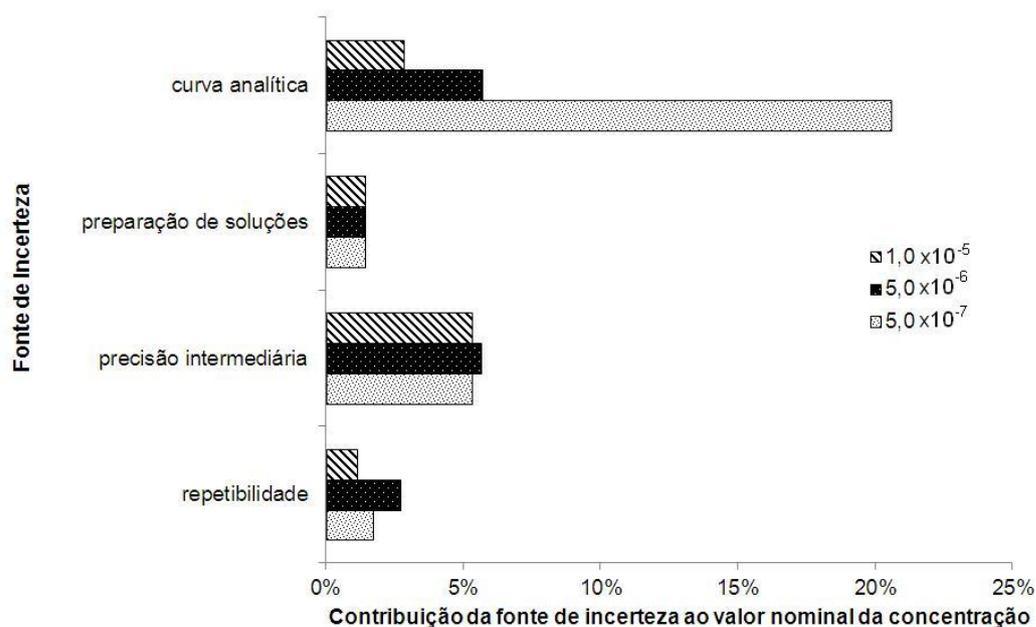


Figura 70 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica, nas concentrações avaliadas ($2,5 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

Pode ser observado que o valor da incerteza associada à preparação de soluções é a que menos influencia o valor da incerteza combinada em todas as concentrações, com um valor de menos de 5% do valor nominal de cada concentração testada. A repetibilidade, atribuída à variação dos resultados obtidos no mesmo dia de análise também não foi um fator muito influente sob o valor da incerteza combinada. Para a menor concentração testada, a curva analítica foi a fonte de incerteza que mais influenciou o valor da incerteza combinada, sendo de até 20% do valor da concentração de VRN, inclusive ao realizar um cálculo específico para essa faixa de concentração, de uma ordem de grandeza a menos do resto da faixa linear do método. Neste caso em particular, este valor alto pode ser atribuído à pouca eficiência da reação fotoquímica nas condições adaptadas para a cromatografia (tampão borato pH 10), para induzir a fluorescência na VRN.

6.2.3.

Aplicação do método cromatográfico na determinação indireta de VRN em medicamento

O método cromatográfico desenvolvido foi aplicado para a determinação indireta da VRN no medicamento Champix®, utilizando comprimidos que contém

1,0 mg de princípio ativo, do mesmo lote e caixa do que os comprimidos para os ensaios de recuperação do método espectrofluorimétrico desenvolvido e reportado na primeira parte do capítulo. A derivatização fotoquímica da VRN foi realizada em três concentrações diferentes dentro da faixa linear do método (n = 3 para cada concentração). Os resultados obtidos na recuperação estão indicados na Tabela 38.

Tabela 38 - Resultados de recuperação de VRN no medicamento Champix® utilizando o método cromatográfico desenvolvido

| Concentração esperada (mol L⁻¹) | 5,0 x 10⁻⁷ | 5,0 x 10⁻⁶ | 1,0 x 10⁻⁵ |
|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Concentração encontrada(mol L ⁻¹) | 5,1 x 10 ⁻⁷ | 4,8 x 10 ⁻⁶ | 9,3 x 10 ⁻⁶ |
| Desvio padrão | 4,8 x 10 ⁻⁹ | 4,2 x 10 ⁻⁸ | 4,7 x 10 ⁻⁸ |
| Recuperação | 102 ± 1,0 | 96 ± 0,8 % | 93 ± 0,46% |
| Massa de VRN (mg) por comprimido | 1,0 ± 0,1 | 0,96 ± 0,08 | 0,93 ± 0,05 |

Pode ser observado nos resultados de recuperação, que as concentrações determinadas nas análises do medicamento estão em concordância com a quantidade de vareniclina indicado pelo fabricante, de 1 mg por comprimido.