



**Juan Jose Garcia Antonio**

**Desenvolvimento e validação metrológica de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ciclofenil após derivação fotoquímica**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Costa Monteiro  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Alessandra Licursi M. C. da Cunha  
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2012



**Juan Jose Garcia Antonio**

**Desenvolvimento e validação metrológica de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ciclofenil após derivação fotoquímica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Costa Monteiro**  
Orientadora

Programa de Pós-Graduação em Metrologia (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio**  
Co-Orientador

Departamento de Química (PUC-Rio)

**Dr<sup>a</sup>. Alessandra Licursi M. C. da Cunha**  
Co-Orientadora

Departamento de Química (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Arthur de Lemos Scofield**  
Departamento de Química (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Wagner Felipe Pacheco**  
Instituto de Química – Universidade Federal Fluminense (UFF)

**Prof. Dr. José Eugenio Leal**  
Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2012.

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

## **Juan Jose Garcia Antonio**

Graduou-se em Engenharia Química pela UNCP (Universidad Nacional Del Centro del Perú) em 2009. Atuou na área de análises laboratoriais em meio ambiente com foco em determinação de metais e avaliação de parâmetros físico-químicos nos laboratórios de J. Ramon, INSPECTORATE, ECOLAB 2007-2010.

### Ficha Catalográfica

Antonio, Juan Jose Garcia

Desenvolvimento e validação metrológica de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ciclofenil após derivação fotoquímica / Juan José Garcia Antonio; orientadora: Elisabeth Costa Monteiro. – 2012.

114 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação, 2012.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Ciclofenil. 3. Derivação fotoquímica. 4. Fluorimetria. 5. Validação metrológica. 6. Cromatografia em fase líquida. I. Monteiro, Elisabeth Costa. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação. III. Título.

CDD: 389.1

Dedico este trabalho as minhas avós Olga e Rosa que sempre me apoiaram, estiveram presentes e acreditaram em mim, me incentivando na busca de novas realizações.

## Agradecimentos

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Elisabeth Costa Monteiro por sua orientação a longo da pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Ricardo Q. Aucélio pela confiança e propor um desafio que está dentro da sua linha de pesquisa, por seus conselhos, generosidade e por ensinar-me a ser perseverante, ele é um exemplo para mim e sempre vou ter a lembrança presente.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Alessandra Licursi M. C da Cunha agradeço pela orientação, ajuda e o acompanhamento ao longo tempo da pesquisa, pois ela foi um dos pilares para a culminação com sucesso da pesquisa.

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

À FAPERJ pelo financiamento do projeto vinculado ao presente trabalho de pesquisa.

Às duas pessoas mais importantes em minha vida: meus pais, aqueles que me formaram com fé e amor e que ao longo da minha vida sempre me guiaram na direção certa, dando-me o seu apoio, conselhos e nos tempos difíceis me incentivaram a ir em frente e perceber o patrimônio mais valioso que poderia receber minha carreira.

Aos meus irmãos Olga, Jenner, Shyntia pela ajuda e a confiança.

A toda a equipe técnica e administrativa da Pós-MQI e da PUC-Rio, em especial para Márcia Ribeiro e Paula Guimarães.

Aos meus colegas do departamento de química: Anastácia e Ana Catalina, em especial, à Ana Paula pelos conselhos e ajuda no momento mais crítico (agradeço pelas palavras e pela ajuda para superar o problema).

À equipe de técnicos do laboratório de LEEA (Leila, Paulo, Júnior, Luís) por a ajuda dada o longo do caminho da pesquisa.

## Resumo

Garcia Antonio Juan Jose; Monteiro, Elisabeth Costa, Aucelio, Ricardo Queiroz. e Cunha, Alessandra Licursi M. C. **Desenvolvimento e validação metrológica de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ciclofenil após derivação fotoquímica.** Rio de Janeiro, 2012. 114p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O ciclofenil é um medicamento antiestrogênico usado em tratamentos de distúrbios ovarianos. Por outro lado, esse efeito em homens resulta em aumento de massa muscular, sendo seu uso proibido para atletas do sexo masculino pelo código mundial antidoping estabelecido pela WADA. Os métodos de espectrofotometria de absorção e de fluorescência permitem quantificar direta ou indiretamente o ciclofenil, porém não são adequados para a análise de amostras mais complexas. Este trabalho propõe o desenvolvimento de um método baseado na cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de ciclofenil usando detecção por fluorescência, após a fotoderivação do ciclofenil. A separação utiliza eluição isocrática (tampão borato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 10/metanol/ 60/40% v/v), e coluna C18 mantida a 35°C. Após a fotoderivação com UV, formaram-se fotoderivados luminescentes, como previsto na literatura, sendo que o fotoderivado com tempo de retenção igual a 2,7 min foi o escolhido para fins quantitativos por ser estável ao longo de 96 h após o processo de derivatização. Foram obtidos os limites de detecção de 6,6 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> e de quantificação de 7,3 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. A faixa de resposta linear se estendeu até 5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (de ciclofenil). As recuperações obtidas em formulações farmacêuticas se apresentaram entre 94 e 105%. Os resultados indicaram que a homogeneidade e estabilidade dos medicamentos de ciclofenil são satisfatórias. As fontes que mais contribuíram para a incerteza de medição estão associadas ao preparo das soluções e à construção da curva analítica.

## Palavras-chave

Metrologia; ciclofenil; derivação fotoquímica; fluorimetria; validação metrológica; cromatografia em fase líquida.

## Abstract

Garcia Antonio Juan Jose; Monteiro, Elisabeth Costa. (advisor), Aucelio, Ricardo Queiroz. (co-advisor) e Cunha, Alessandra Licursi M. C. (co-advisor). **Development and metrological validation of a high performance liquid chromatographic method for the quantification of cyclofenil after photochemical derivatization.** Rio de Janeiro, 2012. 114p. MSc. Dissertation – Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Cyclofenil is an anti-estrogen used in treatments of ovarian disorders. On the other hand, its effect in men results in the increasing of muscle mass, being its use, by male athletes, banned by the World Anti-Doping Code established by World Anti-Doping Agency. Absorption and fluorescence spectrophotometries allow direct or indirect quantification of cyclofenil, however, they are not suitable for the analysis of complex samples. This work proposes the development of a method based on high performance liquid chromatography to determine cyclofenil using photochemical induced fluorescence detection. The separation using isocratic elution (10 mmol L<sup>-1</sup> borate buffer at pH 10/methanol (60/40% v/v), and column C18 maintained at 35°C. After exposing cyclofenil to the UV, fluorescent photoderivatives were formed, as indicated in the literature, with the photoderivative with the retention time of 2.7 min used for quantitative purposes since it is stable for over 96 h after the photoderivatization procedure. The detection limit was  $6.6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> and the limit of quantification was  $7.3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. The linear response range extended up to  $5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (as cyclofenil). Recoveries in pharmaceutical formulations were between 94 and 105%. The results indicated that the homogeneity and stability of cyclofenil tablets are satisfactory. The uncertainty sources that present the greatest contributions to the measurement uncertainty were the ones associated with the preparation of the solutions and the analytical curve.

## Keywords

Metrology; cyclofenil; photochemical derivatization; fluorimetry; metrological validation; high performance liquid chromatography.

# Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>18</b>
1.1. Estudos para a determinação de ciclofenil publicados na literatura	19
1.2. Mecanismos de reação dos derivados do ciclofenil	22
1.2.1. Caracterização dos metabólitos do ciclofenil	22
1.2.2. Caracterização dos fotoderivado do ciclofenil	23
1.2.3. Derivação fotoquímica	25
1.3. Detecção baseada no fenômeno de fluorescência	26
1.3.1. Fluorescência	26
1.4. Cromatografia em fase líquida	30
1.5. Objetivos	36
1.5.1. Objetivo geral	36
1.5.2. Objetivos específicos	37
1.6. Estrutura do trabalho	37
<b>2 Confiabilidade metrológica na determinação de ciclofenil</b>	<b>39</b>
2.1. Rastreabilidade metrológica	40
2.2. Organismos Internacionais	41
2.2.1. BIPM	41
2.2.2. OIML	43
2.2.3. ILAC	44
2.2.4. IMEKO	45
2.2.5. WHO	46
2.2.6. WADA	46
2.2.7. IUPAC	47
2.2.8. ISO/IEC	48
2.3. Contexto Nacional	48
2.3.1. INMETRO	48
2.3.2. ANVISA	50
2.3.3. ABNT	51
2.4. Validação intralaboratorial de método analítico por HPLC	52
2.4.1. Seletividade	53
2.4.2. Resposta linear	54
2.4.3. Faixa de Trabalho e Faixa Linear	55
2.4.4. Limite de detecção e limite de quantificação	56



2.4.5. Tendência/Recuperação	56
2.4.6. Precisão	57
2.4.7. Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise	59
2.4.8. Robustez	60
2.4.9. Comparação da precisão entre métodos	61
2.5. Estimativa da incerteza de medição	61
2.6. Estudos de homogeneidade e de estabilidade	66
<b>3 Materiais e métodos</b>	<b>67</b>
3.1. Reagentes	67
3.2. Materiais descartáveis e vidraria	67
3.3. Instrumentação	68
3.3.1. Reator Fotoquímico	68
3.3.2. Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência	69
3.3.3. Equipamentos auxiliares	70
3.4. Procedimento	71
3.4.1. Lavagem do material	71
3.4.2. Preparo do padrão do analito e das amostras de medicamentos	71
3.4.3. Tratamento fotoquímico	72
3.4.4. Quantificação indireta do ciclofenil	72
<b>4 Resultados e Discussão</b>	<b>74</b>
4.1. Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas	74
4.1.1. Testes de solubilidade	74
4.1.2. Estudo da composição da fase móvel	75
4.1.3. Otimização da derivação fotoquímica	79
4.1.4. Otimização dos parâmetros instrumentais do cromatógrafo	83
4.1.5. Resumo das condições escolhidas	84
4.2. Estudo de estabilidade	86
4.2.1. Estudo de estabilidade de padrão	86
4.3. Estudo de homogeneidade dos comprimidos de ciclofenil	87
4.4. Validação do método	90
4.4.1. Seletividade	90
4.4.2. Limite de detecção e de quantificação do equipamento	91
4.4.3. Resposta linear	91
4.4.4. Robustez	93

4.4.5. Exatidão	94
4.4.6. Precisão	94
4.4.7. Estudo da precisão intermediária	95
4.5. Incerteza de medição	97
<b>5 Conclusão</b>	<b>102</b>
<b>Refências Bibliográficas</b>	<b>104</b>
<b>Anexos: Certificados de calibração da vidraria (balão volumétrico), balança analítica e micro pipetas (10 µL) (100-1000 µL)</b>	<b>109</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: ciclofenil $C_{23}H_{24}O_4$ .	18
Figura 2: Formação do primeiro derivado do ciclofenil que é gerado por hidrólise do ciclofenil (adaptado de Myung S., <i>et al.</i> (2002).	22
Figura 3: Estrutura proposta para os metabólitos do ciclofenil: 1 ciclofenil, 2 metabólito hidroxilado, 3-5 os metabólitos hidroxilados respectivamente nas posições 4, 3 e 2 <i>do anel</i> (adaptado de Gartner, <i>et al.</i> ).	22
Figura 4: Mecanismo sugerido na formação dos fotoderivados do ciclofenil após irradiação UV pelo LDI-TOF-MS (1 é ciclofenil; 2, 3 intermediário; 4 é o fotoderivado).	24
Figura 6: Um dos fotoderivados do ciclofenil que tem estrutura igual a um dos metabólitos do ciclofenil.	25
Figura 7: Diagrama de Jablonski modificado, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após cada molécula absorver um fóton ultravioleta ou visível onde $S_0$ é o estado eletrônico fundamental, $S_1$ e $T_1$ são os estados excitados mais baixos singleto e tripleto, respectivamente. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radiativas. A, absorção; F, fluorescência; P, fosforescência; CI, conversão interna; CIS, cruzamento intersistemas; RV, relaxação vibracional. F e P são transições que podem terminar em qualquer um dos níveis vibracionais de $S_0$ e não apenas no nível de menor energia (Huang K., 2012).	29
Figura 8: Determinação de desvio padrão de um pico cromatográfico, $W = 4\tau$ ( $W$ é a base do triângulo) (adaptado de SKOOG, 2001).	35
Figura 9: Relação entre a pirâmide metrológica e as áreas de referencia utilizadas em medições químicas para verificar a rastreabilidade.	40
Figura 10: Esquema e foto do reator fotoquímico: (A) diagrama do circuito elétrico do reator onde R é reator de 9 W e L1 - L6 são as lâmpadas germicidas; (B) diagrama do fotoreator já montado onde: (1) são os tubos de quartzo que contém as amostras, (2) lâmpadas germicidas, (3) extrator de ar (mesa com ventilador de notebook), (4) sentido de fluxo do ar (entrada de ar ao foto reator), (5) tubo de PVC de	

0,22 m de diâmetro interno x 0,30 m, (6) tampa do fotoreator (que tem um anteparo para evitar a saída de luz UV do fotoreator); (C) interior do fotoreator com duas lâmpadas ligadas; (D) interior do fotoreator com quatro lâmpadas ligadas e (E) interior do fotoreator com seis lâmpadas ligadas.

69

Figura 11: Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters 1525) com (a) detector de fluorescência modelo 2475, (b) bomba binária de alta pressão, (c) forno, (d) foto interna das bombas binárias de alta pressão e (e) foto interna do forno.

70

Figura 12: Amostras do ciclofenil no reator fotoquímico, (A) foto do reator ligado com as amostras, (B) foto do reator desligado com as amostras após 15 min.

72

Figura 13: Amostras de ciclofenil após exposição ao UV por 15 min.

72

Figura 14: Cromatogramas de uma solução  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil usando proporções de metanol/tampão borato (pH 10;  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) v/v na fase móvel iguais a: (a) 70%/30%; (b) 67%/33%, (c) 65%/35%, (d) 62%/38%, (e) 60%/40%.

77

Figura 15: Cromatograma de solução de ciclofenil de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (a) tampão de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , (b) tampão de  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

78

Figura 16: Efeito do valor do pH do tampão no sinal de fluorescência do fotoderivado III do ciclofenil (originalmente na concentração de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Fase móvel contendo metanol/tampão borato  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  60/40% v/v.

78

Figura 17: (a) Amostra exposta a radiação de 6 lâmpadas UV, (b) amostra exposta a radiação de 4 lâmpadas UV, (c) amostra exposta a radiação de 2 lâmpadas UV, (d) ensaio em branco por um tem de 25 min.

80

Figura 18: Fluorescência medida no HPLC-FL em área de pico para os derivados do ciclofenil em função do tempo de exposição ao UV: (a) fotoderivado I, (b) fotoderivado II e (c) fotoderivado III. Condições analíticas experimentais utilizadas: solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em metanol/tampão borato (pH 10,  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) 60/40% v/v, Loop de 20  $\mu\text{L}$ .

81

Figura 19: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  irradiada com UV por: (a) tempo de 40 min, (b) tempo de 30 min, (c) tempo de 20 min, (d) tempo de 15 min, (e) tempo de 10 min, (f) tempo de 5 min, (g) tempo de 0 min. **82**

Figura 20: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  irradiada em metanol/tampão borato ( $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10) 60/40% v/v e fase móvel de mesma composição, variando a temperatura do forno em: (a) 40°C, (b) 35°C, (c) 30°C, (d) 25°C. **83**

Figura 21: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  irradiada em metanol/tampão borato ( $10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10) 60/40% v/v, na temperatura de 35°C e fase móvel de mesma composição, variando o fluxo em: (a)  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , (b)  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ , (c)  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . **84**

Figura 22: Cromatogramas mostrando o pico do fotoderivado III isolado, na injeção das soluções de medicamento do ciclofenil (a) e o branco (b), após 30 min de exposição ao tratamento UV. **85**

Figura 23: Estudo da estabilidade do sinal analítico (fluorescência em 328/374 nm) do fotoderivado III obtido após 30 min de exposição ao UV de uma solução padrão de ciclofenil ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções foram armazenadas na geladeira e no escuro. **86**

Figura 24: Estudo da estabilidade do sinal analítico (fluorescência em 328/374 nm) do fotoderivado III obtido após 30 min de exposição ao UV de uma solução padrão de ciclofenil ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções foram armazenadas na temperatura ambiente e ao abrigo da luz. **87**

Figura 25: Estudo da homogeneidade da quantidade de ciclofenil em três lotes do medicamento Menopax. Amostras expostas ao UV por 30 min e fluorescência medida em 328/374 nm (área integrada do pico em  $t_R = 2,5 \text{ min}$ ) no HPLC. **88**

Figura 26: Cromatogramas mostrando o pico do fotoderivado III isolado do ciclofenil: (a) padrão do analito (b) medicamento (c) ensaio em branco, após exposição ao UV por 30 min. **90**

Figura 27: Curva analítica do fotoderivado III do ciclofenil. **91**

Figura 28: Curva analítica do fotoderivado III do ciclofenil após tratamento UV (injeções  $\pm$  desvio padrão). **92**

Figura 29: Gráfico de resíduos de todas as injeções na faixa linear da curva analítica para determinação do fotoderivado III do ciclofenil após 30 min de tratamento UV.

**93**

Figura 30: Diagrama de causa e efeito mostrando as fontes mais relevantes.

**97**

Figura 31: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada ( $u_c$ ) da medição de ciclofenil após tratamento UV para as seguintes concentrações: (P1)  $3,0 \times 10^{-6}$ ; (P2)  $6,0 \times 10^{-6}$ ; (P3)  $1,2 \times 10^{-5}$  e (P4)  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

**101**

## Lista de tabelas

Tabela 1: Parâmetros analíticos de desempenho (LEÃO, 2000).	53
Tabela 2: Principais valores de Horwitz (INMETRO, 2011).	60
Tabela 3: Divisores para algumas distribuições de probabilidade	63
Tabela 4: Relação entre o nível de confiança e o fator de abrangência em uma distribuição normal.	65
Tabela 5: Resumo das condições ótimas de trabalho para determinação de ciclofenil e de seus derivados por HPLC.	85
Tabela 6: Teste de homogeneidade com comprimidos de Menopax de três lotes distintos.	89
Tabela 7: Parâmetros estatísticos no estudo de homogeneidade.	89
Tabela 8: Resultados da ANOVA para o estudo de homogeneidade com 95% de limite de confiança.	89
Tabela 9: Parâmetros analíticos para avaliação da linearidade.	92
Tabela 10: Avaliação da robustez dos parâmetros experimentais e instrumentais	93
Tabela 11: avaliação da repetibilidade para cada nível de concentração do ciclofenil segundo HorRat	95
Tabela 12: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	95
Tabela 13: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	96
Tabela 14: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (ANOVA: fator unico).	96
Tabela 15: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (ANOVA: fator unico).	96
Tabela 16: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para determinação indireta do ciclofenil após tratamento UV.	100

## Lista de abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMA	Agência Mundial Anti-Doping
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIPM	<i>Bureau International des poids et Mesures</i>
CCAUV	<i>Comité consultatif de l'acoustique, des ultrasons et des vibrations</i>
CCEM	<i>Comité consultatif d'électricité et magnétisme</i>
CCL	<i>Comité consultatif des longueurs</i>
CCM	<i>Comité consultatif pour la masse et les grandeurs apparentées</i>
CCPR	<i>Comité consultatif de photométrie et radiométrie</i>
CCQM	<i>Comité consultatif pour la quantité de matière</i>
CCRI	<i>Comité consultatif des rayonnements ionisants</i>
CCT	<i>Comité consultatif de thermométrie</i>
CCTF	<i>Comité consultatif du temps et des fréquences</i>
CCU	<i>Comité consultatif des unités;</i>
CGPM	Conferência Geral de Pesos e Medidas
CI	Conversão interna
CIPM	Comitê Internacional de Pesos e Medidas
CMD	Concentração média determinada
COI	Comitê Olímpico Internacional
COI	Comitê Olímpico Internacional
CONMETRO	Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
CV	Coeficiente de variação
DCMAS	Rede de Metrologia, Acreditação e Normalização para Países em Desenvolvimento
DPR	Desvio padrão relativo
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICSCA	<i>Industry Cooperation on Standards and Conformity Assessment</i>
IEC	<i>International Elestrotechnical Commission</i>
IFCC	<i>International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
ILAC	<i>International Laboratory Accreditation Cooperation</i>
IMEKO	Confederação Internacional de Medição
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	Organização Internacional para Padronização
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JCGM	Comitê Conjunto para Guias em Metrologia
JCRB	Comissão Mista das Organizações Regionais de Metrologia e do BIPM
JCTLM	Comitê Misto para Rastreabilidade em Medicina Laboratorial
LH	Hormônio luteinizante



LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
OIML	Organização Internacional de Metrologia Legal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Agência Internacional das Nações Unidas
RV	Relaxamento vibracional
S	Desvio-Padrão
SI	Sistema Internacional de Unidades
SINMETRO	Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
TC	Comitês técnicos
UNESCO	Organização das Nações Unidas, para a Educação, a Ciência e a Cultura
UNIDO	<i>United Nations Industrial Development Organization</i>
UV	Luz ultravioleta
VIM	Vocabulário internacional de metrologia
WADA	World Anti-Doping Agency

# 1

## Introdução

O ciclofenil ou bis (p-acetoxifenil)-cicloexilidenometano, que tem a estrutura química como é indicado na Figura 1, é um fármaco de ação antiestrogênica empregado no tratamento da infertilidade feminina, como indutor da ovulação (KENJI, 2001). Posteriormente, o ciclofenil teve sua aplicação estendida a tratamentos de distúrbios hormonais relacionados ao climatério (Ministério da Saúde, 2008).

O ciclofenil age como modificador da síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante. No caso das mulheres, a FSH estimula a produção de óvulos e do hormônio estradiol durante a primeira metade do ciclo menstrual. No caso dos homens, a FSH estimula a produção de espermatozoides (WHO, 1973).

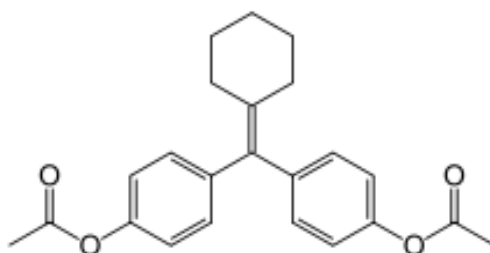


Figura 1: ciclofenil  $C_{23}H_{24}O_4$ .

No organismo masculino, quando o hipotálamo percebe níveis adequados de testosterona, presente tanto em sua forma natural (endógena) ou artificial (exógena), a produção de gonadotrofina é inibida, consequentemente os testículos não recebem o sinal químico para produzir a testosterona. Somente nos organismos masculinos, o ciclofenil interfere no ciclo natural de *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-testículos mediante a ocupação dos receptores de estrogênio, estimulando a liberação de gonadotrofina/testosterona. O consequente aumento da testosterona no sangue provoca um crescimento de massa muscular melhorando o aspecto estético e o rendimento físico, o que pode beneficiar atletas (REA, 2002). Por esse motivo, o uso do ciclofenil por atletas olímpicos é considerado doping.

Em geral, o uso do ciclofenil com o objetivo de aumentar de massa muscular em homens é feito em conjunto com outros anabolizantes, sendo normalmente usado em doses de 200 mg, duas a três vezes por dia, por um período de quatro a seis semanas. Os efeitos adversos observados com o uso do ciclofenil incluem hepatite aguda, anemia hepática, problemas cardiovasculares, aumento do desejo sexual, contração dos testículos, ginecomastia (desenvolvimento das glândulas mamárias em homens) e ondas de calor (Russel and Schachter, 1981; Rossi et al., 1992; REA, 2002; WHO, 1973; Gartner et al., 2008).

Na busca da igualdade de oportunidades e do desenvolvimento bem sucedido de competições justas, a Agência Mundial Antidoping, AMA, (WADA, 2012) elabora e publica anualmente o Código Mundial Antidoping, que é ratificado pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) e submetido aos países membros da Organização das Nações Unidas, para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO).

O Código Mundial Antidoping é uma lista de substâncias e métodos proibidos (*The World Anti-doping Code The 2012 Prohibited list international Standard*, WADA, 2012a) que normaliza a lei contra a dopagem no esporte. No Código Mundial Antidoping, o ciclofenil é classificado como pertencente ao grupo de moduladores hormonais sendo considerado como substância de uso ilícito. Por ser uma substância antiestrogênica, o ciclofenil é considerado um fármaco que melhora artificialmente o desenvolvimento dos esportistas do sexo masculino ao aumentar a massa muscular, força e energia, tornando seu uso desleal nas competições esportivas. Além disso, a Agência Mundial Antidoping considera o uso de ciclofenil como um atentado contra a saúde pública e do esportista (WADA, 2012).

### 1.1.

#### **Estudos para a determinação de ciclofenil publicados na literatura**

Na pesquisa bibliográfica para a determinação do ciclofenil em formulações farmacêuticas foram encontradas poucas metodologias analíticas, as quais são resumidas a seguir:

(i) Cruces J., *et al* (1972) propuseram a determinação de ciclofenil em tecido muscular de boi. A amostra passou por um tratamento prévio para minimizar a presença de componentes de matriz. A técnica usada foi a de cromatografia em fase gasosa (GC) com detecção por ionização por chama. Os

resultados apresentados foram de 95% de recuperação do analito e limite de detecção (LOD) de  $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$  de ciclofenil.

(ii) HASSAN, A. (1994) desenvolveram um método por espectrofotometria de absorção de luz na região do UV-Vis, quantificando indiretamente o ciclofenil por meio de seus produtos de degradação ácida em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As medições foram feitas no comprimento de onda de 272 nm. Os espectros obtidos após tratamento matemático (segunda derivada) foram utilizados para extrair a informação analítica quantitativa. O método foi aplicado na análise de formulação farmacêutica de ciclofenil com recuperações de  $101,06 \pm 0,78 \%$ , porém, não foi informada a capacidade de detecção do método.

(iii) Myung S., *et al.* (2002) utilizaram técnicas de GC com detector de captura de elétrons e por detecção por espectrometria de massas e de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por espectrometria de massas em duas dimensões, o que permitiu a caracterização da estrutura dos metabólitos hidroxilados do ciclofenil em matriz de urina de indivíduos do sexo masculino. Os autores não detectaram o ciclofenil na urina, mas sim seus metabólitos. O trabalho não menciona os limites de detecção de quantificação e demais parâmetros de mérito.

(iv) Pacheco, W.F., *et al.* (2005) propuseram um método de determinação de ciclofenil por voltametria de onda quadrada após derivação fotoquímica do ciclofenil com UV. Os fotoderivados foram detectados na forma de um único pico de corrente na janela de operação do eletrodo de mercúrio (gota pendente). O método permitiu obter um valor de LOD de  $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , com faixa de resposta linear até  $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . O método foi testado para a análise de formulações farmacêuticas e de amostra de urina fortificada com o analito. As recuperações de analito ficaram na faixa de 93,6 a 106,5% com uma repetibilidade de 7% ao longo da faixa de trabalho. Apesar da grande sensibilidade e versatilidade do método para analisar amostras complexas como urina, métodos voltamétricos com eletrodos baseados no mercúrio não cumprem os preceitos da química verde.

(v) Gartner, P., *et al.* (2008) estudaram a síntese dos metabólitos hidroxilados do ciclofenil e caracterizaram suas estruturas químicas usando as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de alta resolução. Os autores identificaram três metabólitos hidroxilados do ciclofenil. Os estudos foram realizados visando à detecção desses metabólitos em urina de indivíduo do sexo masculino. No artigo não foi indicada a capacidade de detecção do método e não foram apresentados estudos de recuperação.

(vi) Pacheco, W.F., *et al*, (2008) desenvolveram um método espectrofluorimétrico para a determinação indireta de ciclofenil por meio da fluorescência de seus fotoderivados (obtidos após tratamento do ciclofenil com UV em solução alcalina). O método permitiu alcançar um valor de LOD de  $1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , com faixa de resposta linear até  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . O método desenvolvido foi testado na análise de formulações farmacêuticas e de amostra de urina fortificadas com o analito. A recuperação do analito foi de  $98,3 \pm 3,9\%$  ( $n=9$ ). A técnica não pôde ser aplicada na determinação de ciclofenil em urina devido à contribuição da fluorescência de componentes da matriz da amostra na mesma região da banda de fluorescência do ciclofenil e de seus fotoderivados, mesmo após a utilização de procedimentos usuais de limpeza de matriz.

(vii) Brabanter N., *et al*, (2012) desenvolveram um método por GC com espectrometria de massa usando um espectrômetro triplo quadrupolo para a detecção de 150 compostos de diferentes classes, entre os quais esteroides, narcóticos, estimulantes, beta-bloqueadores, beta-2-agonistas, e também antagonistas hormonais como o ciclofenil. No estudo, o ciclofenil é quantificado de forma indireta por meio da detecção de seu metabólito 4-hydroxycyclofenil. No trabalho, a validação do método indica apenas dois parâmetros, o LOD de  $25 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$  e o LOQ de  $50 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ . Um valor de incerteza de medição de  $42,77 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$  é apresentado, porém, o cálculo realizado tem por base apenas o parâmetro de repetibilidade.

Dentre os métodos descritos na literatura, somente em um dos trabalhos, Myung S., *et al*. (2002), foi utilizada a técnica de HPLC, que é uma técnica de capaz de separar os metabólitos existentes em matriz biológica. No conjunto dos estudos publicados para determinação de ciclofenil permanecem lacunas com relação à disponibilidade de métodos validados que possam ser aplicados em matrizes simples, como medicamentos, e que potencialmente possam permitir análises de matizes mais complexas, como tecidos e fluidos biológicos. Até então, somente um dos trabalhos publicados apresenta resultados de incerteza de medição (Brabanter N., *et al*, 2012), porém este considera apenas a influência da repetibilidade com resultados que correspondem a uma elevada porcentagem do valor do limite de detecção informado.

## 1.2.

### Mecanismos de reação dos derivados do ciclofenil

#### 1.2.1.

#### Caracterização dos metabólitos do ciclofenil

Myung S., *et al.* (2002) caracterizaram os metabólitos do ciclofenil por meio da técnica de GC com espectrometria de massa, realizando a comparação dos resultados obtidos de amostra de urina sem o uso da medicação (branco) e outra amostra, obtida do mesmo voluntário, após o uso de ciclofenil. O ciclofenil não foi detectado na urina, mas sim, seus metabólitos, denominados derivados M1 e M2I, com tempos de retenção de 9,53 e 10,0 min respectivamente. Os autores propuseram um mecanismo para formação do primeiro derivado do ciclofenil com base no íon molecular detectado em 9,53 min, que apresenta razão massa-carga ( $m/z$ ) igual a 424 Da. Conforme ilustrado na Figura 2, supõe-se a formação do sistema com dois anéis aromáticos ( $m/z = 343$  Da) pela hidrólise do ciclofenil com a perda de  $C_6H_9$ .

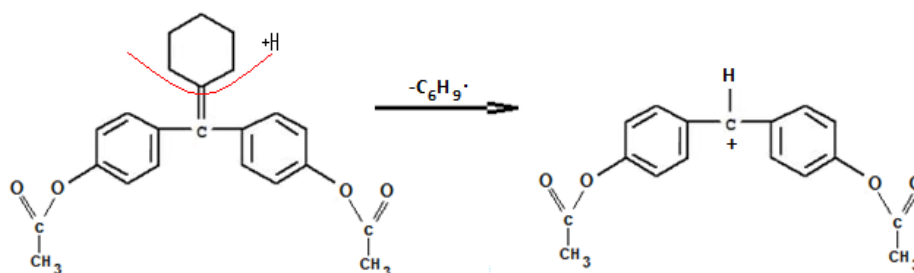


Figura 2: Formação do primeiro derivado do ciclofenil que é gerado por hidrólise do ciclofenil (adaptado de Myung S., *et al.* (2002).

Myung, *et al.* caracterizou os metabólitos do ciclofenil mas não identificou a posição exata da hidroxila no anel ciclohexila. Por sua vez, usando técnica similar, Gartner, *et al.* identificou todos os derivados hidroxilados como mostra na Figura 3.

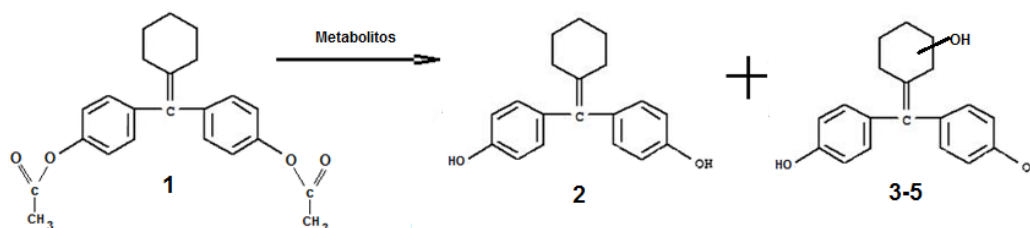


Figura 3: Estrutura proposta para os metabólitos do ciclofenil: 1 ciclofenil, 2 metabólito hidroxilado, 3-5 os metabólitos hidroxilados respectivamente nas posições 4, 3 e 2 do anel (adaptado de Gartner, *et al.*).

### 1.2.2.

#### Caracterização dos fotoderivado do ciclofenil

Estudos para identificação dos derivados do ciclofenil após exposição ao UV foram feitos por Pacheco *et al.* (2008) usando espectrometria de massa (espectrometria de tempo de voo) com a abordagem de desorção/ionização assistida por laser com linha de 337 nm (LDI-TOF-MS) e por GC, com detecção por espectrometria de massa. Após tratamento com UV (pelo menos 15 min), foram identificados dois fotoderivados do ciclofenil, com valores de  $m/z$  iguais a 322 e 288 Da, com redução significativa do pico característico do ciclofenil original ( $m/z = 364$  Da). Baseados nesses dados, os autores propuseram o mecanismo de formação dos fotoderivados em duas etapas (como indicado na Figura 4). Do ponto de vista espectroscópico, a fotoderivação ocasionou um aumento significativo da fluorescência medida, fato decorrente da transformação dos grupos ésteres terminais do ciclofenil em hidroxilas (como indicado na Figura 5). Essas espécies hidroxiladas, em especial a de  $m/z$  288, possuem maior rigidez estrutural, o que implica em maior eficiência quântica fluorescente. Os autores propuseram que o aumento da fluorescência, em duas etapas, que ocorre em função do tempo de irradiação com UV (Figura 6), reflete o alcance de um primeiro patamar de aumento de fluorescência quando a espécie com  $m/z$  322 (estrutura 2 da Figura 4) passa a ser a mais relevante na mistura. O segundo patamar de sinal, significativamente maior que o primeiro, é alcançado com tempos mais longos de exposição à luz, quando o derivado de  $m/z$  288 (estrutura 4 da Figura 4, a de maior rigidez estrutural) passa a ser a espécie relevante na mistura. Do ponto de vista espectral, a posição das bandas do ciclofenil e de seus derivados ocorrem na mesma região, pois os grupos cromóforos destes continuam sendo praticamente os mesmos. Consequentemente, do ponto de vista da medição espectral da fluorescência, se observou o crescimento de uma banda de fluorescência (250/410 nm) em função do tempo. Vale salientar que os autores não fizeram estudos aprofundados sobre a estabilidade desses fotoderivados.

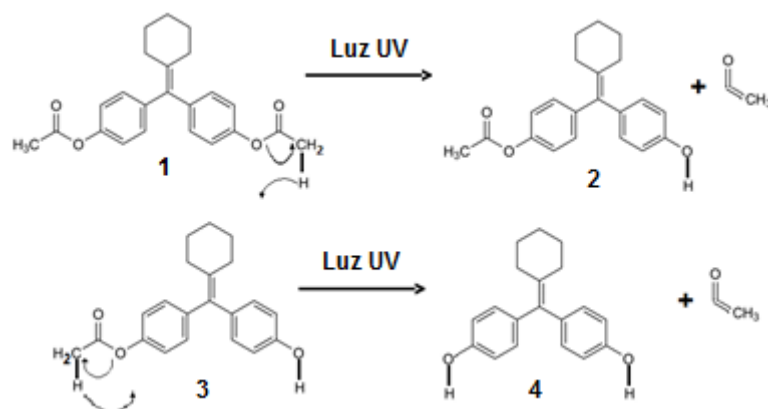


Figura 4: Mecanismo sugerido na formação dos fotoderivados do ciclofenil após irradiação UV pelo LDI-TOF-MS (1 é ciclofenil; 2, 3 intermediário; 4 é o fotoderivado).

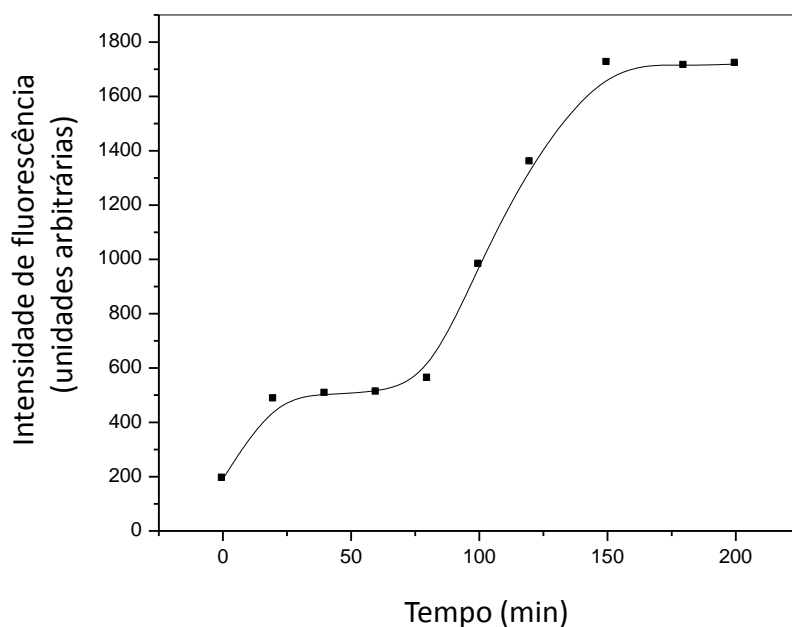


Figura 5: Perfil de aumento de fluorescência de uma solução de  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil em função da exposição ao UV (adaptado de Pacheco, W.F., et al, 2008).

O fato da molécula do fotoderivado com  $m/z$  de 288 Da (Figura 6) assemelhar-se a um dos metabolitos caracterizados pelos grupos de pesquisa mencionados acima, pode potencialmente implicar que um método capaz de quantificar tal fotoderivado apresenta o potencial para a detecção do metabólito do ciclofenil em matriz biológica.



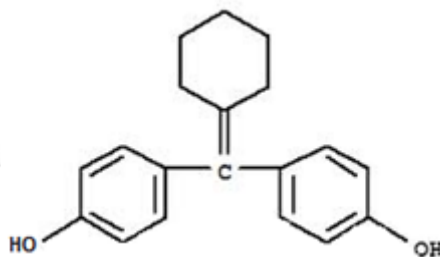


Figura 6: Um dos fotoderivados do ciclofenil que tem estrutura igual a um dos metabólitos do ciclofenil.

### 1.2.3. Derivação fotoquímica

A fotoquímica estuda os mecanismos de reações químicas promovidos por fótons, envolvendo transformações estruturais (em geral irreversíveis) que ocorrem após mudanças nos estados eletrônicos de energia. Na maioria dos casos essas mudanças de níveis de energia de uma molécula estão relacionadas à luz na região do ultravioleta (UV). A radiação do UV próximo abrange a região do espectro eletromagnético entre 200 e 350 nm e, de acordo com o Comitê Internacional da Iluminação, se divide em três faixas: UV-A (de 315 a 400 nm), UV-B (de 280 a 315 nm) e UV-C (abaixo de 280 nm) (Cavicchioli, 2003).

A derivação fotoquímica consiste em um tratamento da amostra utilizando a energia de fótons de luz para transformar o analito de interesse com o objetivo de se obter uma nova forma com propriedades (tempo de retenção, absorvidade molar, eficiência quântica, potencial redox, etc) úteis do ponto de vista analítico. Alternativamente, a incidência de UV sobre uma amostra pode degradar interferentes presentes na matriz da amostra, facilitando sua análise. Tais transformações são provocadas por reações (redução, oxidação, quebras, adições, etc) que ocorrem quando as espécies químicas estão num nível mais elevado de energia.

Provavelmente o tipo mais comum de derivação fotoquímica de analitos é aquela usada para se obter um produto com luminescência mais intensa. De fato, a quebra de estruturas moleculares pelo rompimento de ligações químicas, provocada por fótons, invariavelmente aumenta a rigidez de um dos produtos da reação, amplificando sua eficiência quântica luminescente. Vários são os trabalhos publicados utilizando esta abordagem para melhorar a sensibilidade de uma metodologia luminescente (Gutz, 2003) na qual um produto gerado por

fotoderivatização é utilizado para determinação indireta do composto original (Cavicchioli, 2003).

### 1.3.

#### **Deteção baseada no fenômeno de fluorescência**

##### 1.3.1.

##### **Fluorescência**

O fenômeno luminescente é definido como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível eletrônico de maior energia (excitado) para outro nível de menor energia (em geral o fundamental). A luminescência decorrente da interação com a radiação eletromagnética na região do visível e do UV (isto é, a luminescência estimulada pela absorção de fótons) é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e em fosforescência (SKOOG, 1992).

Ao absorver fótons, a molécula é promovida para um estado de maior energia (estado excitado). Nessa transição, elétrons de valência são promovidos para orbitais de maior energia, provocando um aumento da energia total da molécula. A natureza dos orbitais envolvidos em uma transição eletrônica é um fator importante na determinação das características luminescentes da molécula (SKOOG, 2001). As moléculas orgânicas que são fortemente luminescentes possuem vários elétrons  $\pi$  em sistemas deslocalizados, como no caso das moléculas aromáticas. Na ausência de heteroátomos na estrutura do luminóforo, as transições eletrônicas geralmente envolvem a promoção de um elétron de um orbital ligante  $\pi$  para um orbital antiligante  $\pi^*$ . Este processo é conhecido como transição  $\pi - \pi^*$  e o estado eletrônico resultante é chamado de estado excitado  $\pi \pi^*$ . No caso da presença de heteroátomos (N, O ou S) no sistema conjugado de elétrons, um estado eletrônico pode resultar da promoção de um elétron de um orbital ligante  $n$  para um orbital antiligante  $\pi^*$ ; esta transição é chamada de  $n-\pi^*$  e o estado excitado resultante é denominado  $n\pi^*$ . Se o elétron promovido mantém sua direção relativa de spin original tem-se um estado excitado singleto. Por outro lado, se houver inversão da direção do spin do elétron promovido, tem-se um estado excitado tripleto. O estado fundamental singleto é denominado  $S_0$ . Já os estados excitados singleto e tripleto de menor energia são chamados de  $S_1$  e  $T_1$ , respectivamente, sendo que, normalmente, o estado  $T_1$  possui menor energia que  $S_1$  (SKOOG, 2001, 2005; Huang K, 2012).

Simultaneamente a uma transição eletrônica, ocorrem também mudanças nos estados vibracionais e rotacionais da molécula. Assim, ao se considerar que uma população de moléculas orgânicas, com alguns grupos cromóforos, esteja envolvida no processo de absorção de fótons, bandas espectrais relativamente largas ( $\Delta\lambda$  na ordem de 100 nm) são observadas, pois variações diferentes de energia rotacional e vibracional são associadas às transições eletrônicas sofridas pelo conjunto de moléculas dessa população.

O diagrama de Jablonski (Figura 7) pode ser usado para compreender o que ocorre com uma população de moléculas após a absorção de energia radiativa e as consequências diretas dos processos que se seguem (SKOOG, 2005). Considerando que a população de moléculas, inicialmente em  $S_0$ , seja promovida pela absorção de fótons, esta é distribuída pelos vários níveis rotacionais e vibracionais de um estado eletrônico excitado singlete qualquer ( $S_n$ ). O primeiro processo que se observa é o *relaxamento vibracional* (RV) e conversão interna (CI), que ocorre na escala de tempo da ordem de  $10^{-13}$  a  $10^{-11}$  s, e que em geral, leva essa população para o nível vibracional mais baixo ( $S_1$ ). Essa transição, que não envolve emissão de radiação, pode também ocorrer pela transferência de energia vibracional para outras moléculas (solvente, por exemplo) através de colisões. O efeito final é a conversão de parte da energia do fóton absorvido em calor, que é disseminado por todo o meio (SKOOG, 2005).

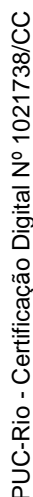
A partir de  $S_1$  podem acontecer vários eventos que competem entre eles para trazer a população de volta para o estado fundamental. A população pode transitar para níveis vibracionais de energia mais elevada que  $S_0$ , que se sobrepõe, em termos de energia, a níveis vibracionais de menor energia de  $S_1$ . Esse processo é chamado de *conversão interna* (CI) e é um processo não-radiativo e ocorre em intervalos de tempo similares ao do relaxamento vibracional. Em seguida, a população pode relaxar de volta aos níveis vibracionais de energia mais baixa que  $S_0$  por meio de RV, dissipando energia na forma de calor (Huang K., 2012).

Alternativamente, a população de molécula pode se transferir de  $S_1$  para  $T_1$  por meio de um evento conhecido como *cruzamento intersistemas* (CIS), ou seja, um processo não-radiativo que envolve a troca de multiplicidade do estado excitado e que tem duração na ordem de  $10^{-7}$  s. A população então segue por RV para o nível vibracional de menor energia de  $T_1$ . A partir deste nível, a população pode se desativar para  $S_0$ . Embora a transição de estados excitados de diferentes multiplicidades seja proibida do ponto de vista da mecânica quântica, o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital.

Este tipo de fenômeno, que consiste no acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e pelo movimento angular do orbital do elétron, promove a mistura de estados excitados da mecânica quântica (SKOOG, 2001, 2005).

A partir de  $S_1$  ou de  $T_1$ , a população de moléculas também pode desativar para  $S_0$ , emitindo fótons. A transição radiativa entre estados de mesma multiplicidade, no caso  $S_1 \rightarrow S_0$ , é chamada fluorescência; e a transição radiativa entre estados eletrônicos com multiplicidades diferentes, no caso  $T_1 \rightarrow S_0$ , é chamada fosforescência. As taxas relativas de CI, RV, CIS, *fluorescência* e *fosforescência* dependem: (i) da estrutura da molécula, (ii) do solvente onde essas moléculas se encontram dissolvidas, (iii) da presença de espécies químicas concomitantes e (iv) de outras condições como a temperatura e a pressão. Pode-se observar na Figura 7 que a energia da *fosforescência* é menor do que a energia da *fluorescência*, de forma que as bandas fosforescentes aparecem em comprimentos de onda maiores do que as bandas fluorescentes (Huang K., 2012).

A fluorescência, ao contrário da fosforescência, é um fenômeno corriqueiro, mas sofre forte competição dos processos não-radiativos de desativação do estado excitado. Consequentemente, tanto a estrutura do luminóforo quanto as condições do meio no qual estes se encontram devem ser bastante favoráveis para permitir a observação da fluorescência. O tempo de vida (tempo necessário para que a emissão decaia a  $1/e$  de seu valor inicial) da fluorescência é relativamente mais curto (da ordem de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  s), enquanto que o tempo de vida da fosforescência é mais longo ( $10^{-6}$  a  $10^2$  s), em consequência da complexidade do processo de troca de multiplicidade.



PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1021738/CC

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1021738/CC

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1021738/CC

#### 1.4.

#### Cromatografia em fase líquida

Na cromatografia líquida, a fase móvel no estado físico líquido é usada para separar espécies químicas semelhantes por meio dos diferentes coeficientes de partição e que determinam o tempo relativo que cada espécie passa na fase móvel e na fase estacionária. A cromatografia líquida é denominada de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC) quando a fase móvel é empacotada numa coluna na forma de partículas esféricas muito pequenas (da ordem de micrômetros) requerendo-se o uso de alta pressão para eluir a fase móvel por entre os interstícios do empacotamento. Esse tipo de empacotamento gera uma área superficial de contato de várias centenas de metros quadrados por grama, o que faz com que essa abordagem tenha capacidade significativamente amplificada para separar espécies químicas, focando-as em zonas de tempo relativamente estreita, com tempos de retenção característicos (SKOOG, 2005; Huang K, 2012).

HPLC é uma técnica de separação que, na sua modalidade analítica, permite a quantificação de substâncias em misturas complexas. Uma separação bem-sucedida requer o alcance de um equilíbrio adequado de forças intermoleculares entre os três participantes ativos do processo de separação: (i) o soluto, (ii) a fase móvel e (iii) a fase estacionária. Na cromatografia dita de fase reversa, a fase estacionária tem caráter apolar enquanto a fase móvel é mais polar. Essa abordagem é muito eficiente na separação de classes de espécies químicas das mais variadas, muitas vezes com fases móveis contendo uma fração relevante de água, o que é muito interessante do ponto de vista da química verde (SKOOG, 2001, 2005).

Algumas características e pré-requisitos importantes para a escolha da fase móvel é sua pureza, polaridade, viscosidade e pressão de vapor. Gases dissolvidos na fase móvel devem ser retirados para minimizar a formação de bolhas (o que é crítico em solventes com maior pressão de vapor). A fase móvel deve ser composta de solventes altamente miscíveis (se formada por mais de um solvente) e deve solubilizar plenamente a amostra injetada contendo os analitos além de coadjuvantes como componentes de sistemas tampão.

A eluição pode ser isocrática, na qual a composição da fase móvel e as outras condições de eluição são mantidas constantes ao longo de todo o processo de separação. Quando a eluição é feita realizada com aplicação de gradiente, varia-se, de modo planejado, a composição dos solventes na fase

móvel podendo-se variar algum outro parâmetro como vazão e temperatura da coluna. A aplicação de gradiente melhora a separação do ponto de vista da resolução das zonas e na rapidez da corrida cromatográfica. Conforme a composição do solvente varia, a polaridade também é alterada (a força do eluente diminui quando o solvente se torna mais polar) (SKOOG, 2005; Lanças, 2009).

A cromatografia líquida usada para a separação e quantificação de espécies moleculares permite diferentes modos de detecção. Os mais tradicionais e práticos são os baseados em medição de luz transmitida ou emitida, no caso, a fluorescência de espécies moleculares (Lanças, 2009).

O equilíbrio da distribuição de solutos na cromatografia pode ser resumido na Equação (1) e na Equação (2)

$$A_{\text{movel}} = A_{\text{estacionaria}} \quad (1)$$

$$K = \frac{C_s}{C_M} \quad (2)$$

Onde:

A: soluto

K: constante de equilíbrio (razão de distribuição ou coeficiente de distribuição) que é constante em uma ampla faixa de concentração de analitos na fase móvel.

C<sub>S</sub>: concentração molar do soluto na fase estacionária

C<sub>M</sub>: concentração molar do soluto na fase móvel.

O tempo de retenção ( $t_R$ ) é o tempo gasto pelo analito desde a injeção da amostra até este ser detectado. Já o tempo morto  $t_M$  é o tempo requerido para que as espécies não retidas na coluna alcancem o detector. A velocidade média de migração do soluto,  $\bar{v}$ , e a velocidade linear média,  $u$ , estão descritas na Equação (3) e na Equação (4) que relacionam  $t_R$  ou  $t_M$  com o comprimento,  $L$ , da coluna cromatográfica.

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (3)$$

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (4)$$

A relação entre  $\bar{v}$ , e  $u$ , é proporcional à fração do tempo,  $f$ , que o analito reside na fase móvel, Equação (5).

$$\bar{v} = u \cdot f \quad (5)$$

O numero total de matéria de soluto, na fase móvel é igual à concentração em quantidade de matéria ( $C_M$ ) do soluto nesta fase multiplicado pelo volume da fase móvel ( $V_M$ ). Da mesma forma, a quantidade do soluto na fase estacionária é obtida pelo produto da concentração molar do soluto ( $C_S$ ) na fase estacionária e seu volume  $V_S$ , dessa forma a Equação (5) passa a ser expressa como indicado na Equação (6) e na Equação (7).

$$\bar{v} = u \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} \quad (6)$$

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_M V_M}} \quad (7)$$

Ao se substituir a Equação (2) na Equação (7), tem-se a Equação (8) que é uma expressão para a velocidade de migração do soluto em função da constante de distribuição e dos volumes da fase estacionária e móvel.

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + \frac{K V_S}{V_M}} \quad (8)$$

Para uma espécie A, o fator de retenção se define como descrito na Equação (9):

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (9)$$

Onde  $K_A$  é o coeficiente de distribuição da espécie A. Substituindo a Equação (9) na Equação (8) obtém-se a Equação (10):



$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + k'_A} \quad (10)$$

Que pode ser transformada na Equação (11) a partir das relações entre velocidade média de migração do soluto e a velocidade linear média seguida da reordenação para isolar o termo  $k'_A$ .

$$K'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (11)$$

O fator de seletividade  $\alpha$  de uma coluna para diferentes espécies A e B é definido na Equação (12).

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (12)$$

Onde  $K_B$  é o coeficiente de distribuição para a espécie com maior tempo de retenção na coluna B e  $K_A$  é o coeficiente de distribuição para a espécie menos retenida A. Então  $\alpha$  sempre é maior que a unidade.

Usando uma substituição de variáveis, tomando como base a Equação (9) e de igual forma para a espécie B na Equação (12) se obtém na Equação (13) uma relação entre os fatores de retenção para os analitos.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (13)$$

A partir da combinação da Equação (11) e da Equação (13), se obtém a Equação (14) que determina  $\alpha$  a partir de dados do cromatograma.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (14)$$

As formas dos picos cromatográficos num cromatograma são similares às curvas de distribuição normal, o que resulta em pequenas diferenças nos tempos de retenção da população de um mesmo tipo de espécie química dentro de uma zona. Esses alargamentos das zonas se intensificam aumentam à medida que

aumenta o tempo de permanência das espécies na coluna e são inversamente proporcionais à velocidade da fase móvel (fluxo da fase móvel) (SKOOG, 2001).

Para descrever a eficiência da coluna, o número de pratos teóricos  $N$  é usado. O valor de  $N$  é calculado pela relação entre o comprimento da coluna  $L$  (em cm) e a altura do prato  $H$ , como mostrado na Equação (15).

$$N = \frac{L}{H} \quad (15)$$

Quanto maior o número de pratos teóricos e/ou menor a altura do prato, maior será a eficiência da coluna. A equação da altura do prato é dada conforme a Equação (16), onde  $\sigma^2$  representa a variância da zona cromatográfica (de formato gaussiano). Assim, o  $H$ , em termos de formato de uma zona com comprimento  $L$ , é definido como a distância linear entre o tempo de retenção e  $1\sigma$ . Como a área sob a curva de distribuição normal limitada por  $\pm\sigma$  é aproximadamente 68% da área total, a altura de prato que contém 34% das espécies de uma zona cromatográfica.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (16)$$

Num cromatograma característico o eixo da abscissa está em termos de tempo de retenção ( $t_R$ ). A variância do pico do analito pode ser obtida por aproximação gráfica simples, onde se usa a variável  $\tau$  no lugar de  $\sigma$ , pois este último tem unidade em  $\text{cm}^2$ . Essas variáveis se relacionam conforme Equação (17):

$$\tau = \frac{\sigma}{\frac{L}{t_R}} \quad (17)$$

Onde:

$\frac{L}{t_R}$ : é a velocidade media linear da espécie em  $\text{cm s}^{-1}$

Na Figura 8 é ilustrada uma forma simples para deduzir  $\tau$  ( $\tau = w/4$ ) e  $\sigma$ , Equação (18), a partir de um cromatograma. Duas tangentes são traçadas dos

pontos de inflexão de cada lado de pico cromatográfico e são estendidas até a interseção formando um triângulo com a linha de base do cromatograma.

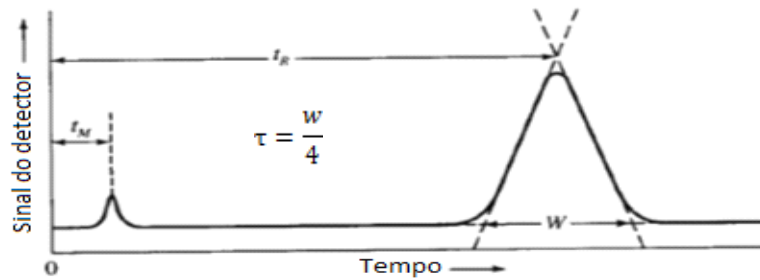


Figura 8: Determinação de desvio padrão de um pico cromatográfico,  $W = 4\tau$  ( $W$  é a base do triângulo) (adaptado de SKOOG, 2001).

A área do triângulo é aproximadamente 96% da área total do pico em um intervalo de  $\pm 2\sigma$ . Assim, as interseções indicam um comprimento máximo de aproximação de  $\pm 2\tau$  sendo  $w = 4\tau$ , onde  $W$  é a base do triângulo.

Ao substituir esta relação na Equação (17) tem-se a Equação (18).

$$\sigma = \frac{LW}{4t_R} \quad (18)$$

Paralelamente substituindo  $\sigma$  na Equação (16), tem-se a Equação (19).

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad (19)$$

Para obter  $N$ , substituindo a Equação (19) na Equação (15) obtém-se a Equação (20), que possibilita o cálculo do número de pratos teóricos. Assim, o valor de  $N$  pode ser calculado a partir das medições de  $t_R$  e  $W$ . Já para calcular  $H$ , deve-se conhecer o comprimento do enchimento da coluna  $L$ . Esses dois parâmetros,  $N$  e  $H$ , são utilizados com frequência para avaliar a eficiência da coluna.

$$H = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (20)$$

Um dos principais parâmetros que afetam a eficiência da coluna são o tamanho e a uniformidade das partículas da fase estacionária. A eficiência melhora à medida que as partículas diminuem e são mais homogêneas, como consequência da diminuição do valor de  $H$  e do aumento do valor de  $N$ . Partículas pequenas e de tamanho homogêneo aumentam a resolução, pois promovem uma vazão mais uniforme através da coluna e uma diminuição da distância através da qual o soluto tem que se difundir na fase móvel.

A resolução,  $R_s$ , de uma coluna é uma medida quantitativa de sua capacidade para a separação entre dois analitos A e B. A Equação (21) é uma das que descreve o cálculo de  $R_s$  de uma separação onde  $W_A$  e  $W_B$  são os intervalos de tempo que representam as bases das zonas desses analitos. Uma resolução de 1,5 permite uma separação completa das substâncias de uma mistura.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (21)$$

O parâmetro  $N$  e  $R_s$  podem ser relacionados pela Equação (22) abaixo cuja obtenção não será demonstrada com detalhes.

$$N = 16R_s^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2 \quad (22)$$

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. Objetivo geral

Desenvolver, otimizar e validar, incluindo com cálculo da estimativa da incerteza de medição, um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de ciclofenil, de forma indireta após derivação fotoquímica, em formulações farmacêuticas.

### 1.5.2.

#### Objetivos específicos

- Identificar e estudar os documentos normativos/regulatórios existentes no Brasil e no mundo relacionados à quantificação de ciclofenil em formulações farmacêuticas e validação de métodos analíticos.
- Otimizar o procedimento de derivação fotoquímica para a formação dos fotoderivados do ciclofenil.
- Identificar os fotoderivados do ciclofenil no cromatograma após exposição à luz UV-vis.
- Otimizar os parâmetros críticos experimentais e instrumentais de modo que se possa desenvolver um método analítico para quantificação de forma indireta de ciclofenil, com boa sensibilidade e resolução.
- Validar o método analítico desenvolvido, considerando todos os requisitos indicados nos documentos vigentes.
- Estimar a incerteza de medição e propor ações para minimizar as principais fontes de incerteza do método analítico.
- Estudar a homogeneidade e a estabilidade do ciclofenil.
- Aplicar o método desenvolvido em uma matriz real (fármaco de ciclofenil).

### 1.6.

#### Estrutura do trabalho

A presente dissertação está estruturada em cinco capítulos cujos conteúdos são indicados abaixo.

Capítulo 1 – apresenta texto introdutório contendo a motivação e relevância do trabalho desenvolvido, uma revisão da literatura sobre a determinação de ciclofenil, além de alguns conceitos fundamentais à compreensão da dissertação.

Capítulo 2 – apresentam-se os principais organismos que compõem a estrutura para a confiabilidade metrológica e os documentos regulatórios relacionados ao tema do presente trabalho, bem como os principais conceitos associados aos procedimentos de validação de métodos analíticos e estimativa da incerteza de medição.

Capítulo 3 – descrevem-se os materiais e métodos utilizados no presente trabalho para o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida

de alta eficiência utilizando detector de fluorescência para quantificação do ciclofenil após derivação fotoquímica

Capítulo 4 – apresentam-se os resultados obtidos e a discussão sobre os mesmos.

Capítulo 5 – são apresentadas as conclusões da dissertação e indicadas sugestões para trabalhos futuros.

## 2

## Confiabilidade metrológica na determinação de ciclofenil

A Metrologia engloba todos os aspectos teóricos e práticos da medição, qualquer que seja a incerteza de medição e o campo de aplicação (VIM, 2012). Possui três áreas de aplicação: a Metrologia Científica, a Metrologia Industrial e a Metrologia Legal. A Metrologia Científica trata do desenvolvimento de padrões de medida e de sua conservação. A metrologia Industrial abrange todos os instrumentos de medição usados na indústria e em atividades de ensaios. Neste sentido, a Metrologia Científica e a Metrologia Industrial são fundamentais ao crescimento e inovação tecnológica, promovendo a competitividade e favorecendo o desenvolvimento científico e industrial (INMETRO). A metrologia Legal é a parte da metrologia relacionada às atividades associadas às exigências referentes às medições, às unidades de medida, aos instrumentos e aos métodos de medição.

A validação de um método analítico é uma ferramenta da metrologia usada para garantir a qualidade do método, suportado por dados laboratoriais documentados que atendam aos requisitos das instituições nacionais, tais como Inmetro e Anvisa no Brasil, e a entidades internacionais, tais como Bureau Internacional de Pesos e Medidas, Organização Internacional de Metrologia Legal, e outras.

A Incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. A incerteza de medição inclui componentes provenientes de efeitos sistemáticos, tais como componentes associadas a correções e a valores atribuídos a padrões. A incerteza de medição geralmente engloba muitas componentes. Algumas delas podem ser estimadas por uma avaliação do Tipo A da incerteza de medição, a partir da distribuição estatística dos valores provenientes de séries de medições e podem ser caracterizadas por desvios-padrão. As outras componentes, as quais podem ser estimadas por uma avaliação do Tipo B da incerteza de medição, podem também ser caracterizadas por desvios-padrão estimados a partir de funções de densidade de probabilidade baseadas na experiência ou em outras informações (VIM, 2012, JCGM, 2012).

## 2.1. Rastreabilidade metrológica

A rastreabilidade metrológica é uma propriedade de um resultado de medição pela qual, tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia interrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (VIM, 2012). Para esta definição, a “referência” pode ser uma definição de uma unidade de medida por meio de sua realização prática, ou um procedimento de medição que inclui a unidade de medida para uma grandeza não ordinal, ou um padrão (VIM, 2012).

A rastreabilidade metrológica é propriedade de um resultado de medição pela qual, tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (VIM, 2012). A rastreabilidade dos resultados químicos se verifica globalmente utilizando um valor de referência, que pode ser dado pela concentração de um material de referência certificado (MRC), o valor obtido por um teste Interlaboratorial ou pela concentração encontrada por um método de referência publicado. Cada uma dessas referências, teoricamente, tem um nível de rastreabilidade à unidade fundamental, o mol. Na Figura 9 é mostrada a relação entre a pirâmide metrológica e as diferentes referências, utilizando para verificar a rastreabilidade ao Sistema Internacional (SI).



Figura 9: Relação entre a pirâmide metrológica e as áreas de referencia utilizadas em medições químicas para verificar a rastreabilidade.

A seguir, alguns dos termos mais utilizados em metrologia química, segundo VIM, 2012:

**Mensurando:** Grandeza que se pretende medir;



**Material de referência certificado (MRC):** material de referência acompanhado de documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos;

**Material de referência (MR):** material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas;

**Padrão de medição:** realização da definição de uma dada grandeza, com um valor determinado e uma incerteza de medição associada, utilizada como referência.

**Material de referência certificado (MRC):** Material de referência acompanhado duma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos.

Na área de metrologia química, caracterizada por uma diversidade de produtos e complexidade de matrizes, o uso de materiais de referência certificados garante a qualidade e a confiabilidade das medições por meio de rastreabilidade metrológica. No entanto, a quantidade de MRC disponíveis é muito limitada. No caso da presente pesquisa, não se encontrou disponível o MRC para ciclofenil.

## 2.2. Organismos Internacionais

### 2.2.1. BIPM

O *Bureau International des poids et Mesures*, BIPM foi criado em 20 de maio de 1875 em Paris (França), com a assinatura da Convenção do Metro por 17 países entre os quais, o Brasil faz parte. O BIPM é um organismo intergovernamental que está sob a supervisão do Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM), e ambos sob a autoridade da Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM). Os membros do CIPM são eleitos pela CGPM, que é composta pelos representantes dos governos dos países membros e se reúne a cada quatro anos (BIPM, 2012).

O trabalho do BIPM consiste em fornecer a base para um sistema único e coerente de medidas para todo o mundo, que seja rastreável no Sistema Internacional de Unidades (SI). O trabalho do CIPM não se limita somente à

disseminação direta das sete unidades base do SI, ele também coordena as comparações internacionais dos padrões.

A seguir se encontram listados os comitês consultivos estabelecidos pelo CIPM (BIPM, 2012a):

- CCAUV: *Comité consultatif de l'acoustique, des ultrasons et des vibrations*;
- CCEM: *Comité consultatif d'électricité et magnétisme*;
- CCL: *Comité consultatif des longueurs*;
- CCM: *Comité consultatif pour la masse et les grandeurs apparentées*;
- CCPR: *Comité consultatif de photométrie et radiométrie*;
- CCQM: *Comité consultatif pour la quantité de matière – métrologie en chimie*;
- CCRI: *Comité consultatif des rayonnements ionisants*;
- CCT: *Comité consultatif de thermométrie*;
- CCTF: *Comité consultatif du temps et des fréquences*;
- CCU: *Comité consultatif des unités*;

O CCQM que é comitê consultivo mais diretamente ligado ao tema do presente trabalho. O CCQM foi criado em 1993 e é responsável pelo estabelecimento de métodos primários para a medição da quantidade de matéria de equivalência internacional entre os laboratórios nacionais (BIPM, 2012b).

O CCQM estabeleceu diferentes grupos de trabalho, listados abaixo.

- CCQM Working Group on Key Comparisons and CMC Quality (KCWG);
- CCQM Working Group on Gas Analysis (GAWG);
- CCQM Working Group on Electrochemical Analysis (EAWG);
- CCQM Working Group on Inorganic Analysis (IAWG);
- CCQM Working Group on Organic Analysis (OAWG);
- CCQM Working Group on Bioanalysis (BAWG);
- CCQM Working Group on Surface Analysis (SAWG).

Os *Joint Committees* são comitês variados do BIPM com outras organizações internacionais criadas para tarefas específicas de interesse comum e são quatro:

- JCGM: Comitê Conjunto para Guias em Metrologia;
- JCRB: Comissão Mista das Organizações Regionais de Metrologia e do BIPM;

- JCTLM: Comitê Misto para Rastreabilidade em Medicina Laboratorial;
- DCMAS Rede: Rede de Metrologia, Acreditação e Normalização para Países em Desenvolvimento.

As tarefas do JCGM são manter e promover o uso do guia para a expressão da incerteza de medição, mais conhecido como GUM, e do Vocabulário Internacional de termos básicos e gerais em metrologia, conhecido como VIM. Estes dois documentos foram extensamente utilizados para a concretização da pesquisa reportada nessa dissertação (BIPM, 2012c).

O JCTLM foi criado em 2002 por meio de uma declaração de cooperação entre o Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM), a Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC), e o *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC), em resposta à implementação da Comunidade Europeia 98/79/CE Diretiva relativa aos dispositivos médicos *in vitro*. O JCTLM tem dois grupos de trabalho que estabelecem uma lista de materiais de referencia certificados de ordem superior, procedimentos de medição, métodos e serviços de medição dos laboratórios de referencia (JCTLM, 2012).

### 2.2.2. OIML

Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML) é uma organização intergovernamental que foi criada em 1955 com o objetivo de promover e harmonizar os procedimentos da metrologia legal no mundo. É composta por Estados Membros, que são os países que participam ativamente das atividades técnicas da OIML, e por Estados Correspondentes, que são países observadores (OIML, 2012).

Desde 1955 a OIML desenvolve um importante papel na estrutura técnica global na elaboração dos requisitos internacionais referentes à fabricação e utilização de instrumentos de medição destinados, aplicados e relacionados à metrologia legal. A OIML possui 18 comitês técnicos, dentre os quais o TC-17 (instrumentos de medição físico-químicos) se dedica diretamente à área de química. O TC-16 (*Instruments for measuring pollutants*), por sua vez, em seu subcomitê (TC 16/SC 3: *Pesticides and other pollutant toxic substances*), publicou a recomendação 112 (TC16/SC3 R112) que contempla instrumentos de medição por HPLC em aplicações relacionadas a pesticidas e outras substâncias

tóxicas (R 112: *High performance liquid chromatographs for measurement of pesticides and other toxic*)(OIML, 2012a, 2012d).

O Brasil participa junto a OIML e tem o reconhecimento internacional (certificação internacional). Este sistema possibilita que qualquer fabricante de um instrumento de medição, associado à metrologia legal, possa solicitar um certificado OIML a um país membro que faça parte do sistema (no caso do Brasil, ao Inmetro). Segundo estatística realizada pelo Banco Mundial em 2007 (OIML, 2012), os países membros do OIML representam 96% da economia mundial, o que destaca a importância da metrologia legal no mundo (OIML, 2012b).

### 2.2.3. ILAC

O Laboratório Internacional de Cooperação e Acreditação, ILAC (*International Laboratory Accreditation Cooperation*) é uma corporação internacional de acreditação de laboratórios e de inspeção cujo objetivo é apoiar e desenvolver a cooperação internacional para facilitar o comércio internacional sem barreiras técnicas (ILAC, 2012)

O ILAC estabelece uma parceria de mútua cooperação com organizações internacionais para alcançar os objetivos compartilhados. Entre tais organizações pode-se citar o CIPM, a *Industry Cooperation on Standards and Conformity Assessment* (ICSCA), a *international accreditation fórum - International Organization for Standardization* (IAF-ISO), a *International Organization for Standardization* (ISO), a *United Nations Industrial Development Organization-Industry Cooperation on Standards* (UNIDO-IAF), a *International Electrotechnical Commission* (IEC), a *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), a *Industry Cooperation on Standards - Organização Internacional de Metrologia Legal* (IAF OIML) e o *World Anti-Doping Agency* (WADA) (ILAC, 2012a).

ILAC publica os trabalhos que fazem parte dos critérios de avaliações, que estão na área de nosso interesse (ILAC, 2012b):

- ILAC G17: 2002 Conceitos de incerteza de medição base na ISO/IEC 17025.
- ILAC P10: 2002 Rastreabilidade dos Resultados de Medição.
- ILAC P14: 12/2010 Política de incerteza na calibração.

#### 2.2.4. IMEKO

A Confederação Internacional de Medição (IMEKO), criada em 1958 em Budapeste - Hungria, é uma confederação não governamental que tem representantes em 39 países membros.

Os membros de IMEKO são as organizações e sociedade científica ou comitês técnicos que estão comprometidas com as diferentes áreas da metrologia. A associação são os representantes das instituições de metrologia ou pessoas relacionadas com a metrologia (ensino superior, indústria, usuários de instrumentos etc.).

O IMEKO tem como objetivo promover o intercambio de informações científicas e técnicas a nível internacional em áreas como medição, instrumentação e reforço da cooperação internacional entre cientistas, engenheiros de pesquisa e indústria. O IMEKO é tem a responsabilidade de considerar os desafios da ciência e da tecnologia de medição e engenharia de instrumentação provenientes das áreas de aplicação e importantes para formar visões para o futuro desenvolvimento de sociedade humana. O grupo técnico (Task Forces) do IMEKO que tem maior relação com o trabalho dessa dissertação é o TC24 (Chemical Measurements), estabelecido em 2008 e que tem como objetivo a promoção de fórum internacional de colaboração efetiva em química analítica com o objetivo de melhorar a confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade das medições químicas em um grande número de setores (IMEKO, 2012).

O âmbito do TC 24 abrange todos os domínios e áreas envolvidas com medições analíticas, dando especial atenção aos setores ligados ao meio ambiente, alimentação e saúde, priorizando as questões sociais. O TC 24 proporciona uma plataforma para o intercâmbio entre os químicos analíticos, metrologistas especialistas. As atividades do TC24 são:

- Utilização de resultados de dados de comparação entre laboratórios e programas de ensaios de proficiência, "rastreabilidade" do valor atribuído - Rastreabilidade das medições ambientais em diferentes matrizes (água, solos, sedimentos etc.) em níveis limites de regulação;
- Melhoria das análises de especiação de metais - Rastreabilidade das medições químicas no setor de saúde - Rastreabilidade de medições no local;

- Levantamento das necessidades e requisitos metrológicos (materiais de referência, métodos de referência, calibração etc.) em determinados setores industriais (IMEKO, 2012).

### **2.2.5. WHO**

A Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health*), criada em 1948 é uma Agência Internacional das Nações Unidas (ONU), sendo responsável pelo setor da saúde. Tem missão de ajudar os países a resolver questões de saúde pública, além de apoiar e promover pesquisas na área. Com a mediação da OMS, os países podem lidar conjuntamente com problemas globais de saúde pública (OMS, 2012).

Entre as publicações da WHO, a quantificação de ciclofenil não é citada. Somente são apresentadas informações relacionadas à aplicação na área da saúde.

A seguir, estão listados alguns documentos relacionados ao tema do presente trabalho (WHO, 2012):

- “Treatments for suppression of lactation” (Review). Oladapo OT, Fawole B.;
- WHO Drug Information Vol. 26, No. 1, 2012,
- WHO Drug Information Vol. 26, No. 2, 2012.

### **2.2.6. WADA**

Por a iniciativa do Comitê Olímpico Internacional (COI) foi convocada a primeira Conferencia Mundial sobre Doping no esporte em 24 de fevereiro de 1999. Desse encontro resultou a declaração de Lausanne – Suíça com a proposta da criação da Agência Mundial Antidopagem, WADA (*World Anti-Doping Agency*) em 10 de novembro de 1999 em Lausanne (WADA, 2012).

A WADA é uma organização internacional independente que tem a missão de promover, coordenar e monitorar, a nível internacional a luta contra o doping no esporte, sob todas as formas (WADA, 2012).

A WADA é composta por representantes dos governos do mundo e movimentos olímpicos (esportivos) que dão o financiamento em partes iguais.

O WADA tem sete áreas que são de responsabilidades atribuídas da agencia pelo Código Mundial Antidoping, que é o documento que estabelece e

harmoniza as regras e políticas Antidoping em todos os esportes e áreas do mundo (Antidoping, 2006).

- O Código: Aceitação, Implementação e Cumprimento;
- Ciência e Medicina;
- Testes Fora de Competição;
- Programa de Educação Atleta-Outreach;
- Educação;
- Desenvolvimento Antidoping; Coordenação Antidoping (ADAMS);

As publicações do WADA que serão usadas nesta pesquisa são listadas a seguir:

- *The 2012 prohibited list international standard*;
- *El Estándar Internacional de Autorización de Uso Terapéutico (documento en español)*;
- WADA Technical Document – TD2010IDCR (*identification criteria for qualitative assays incorporating column chromatography and mass spectrometry*);
- WADA Technical Document – TD2010BAR (*Blood Analytical Requirements for the Athlete Biological Passport*);
- WADA Technical Document – TD2012INDEX (*WADA Technical Documents Index*);
- *WADA Drug Testing Standards*;
- *Anabolic steroids: action mechanisms and effects on the cardiovascular system Esteroides anabólicos: mecanismos de acción e efecto sobre el sistema cardiovascular.*

### 2.2.7. IUPAC

A União Internacional de Química Pura e Aplicada IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) foi criada em 1919 por químicos da indústria e da acadêmica. A IUPAC é um organismo internacional, não governamental criado por necessidade de padronização internacional em química (padronização de pesos, medidas, nomes, símbolos) (IUPAC, 2012). A IUPAC esta composta por representantes da sociedade química dos diferentes países membros sendo uma autoridade mundial em nomenclatura, terminologia química e também em métodos padronizados de medição de pesos atômicos (IUPAC, 2012, 2012a).

A IUPAC tem publicações referentes à cromatografia líquida de alta eficiência:

- Relatório Técnico 1998: *guidelines for calibration in analytical chemistry*.
- Relatório Técnico 2002: *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*.
- Relatório Técnico 2004: *guidelines for calibration in analytical chemistry part 2. multispecies calibration relatório técnico 2006: uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration*.

### **2.2.8. ISO/IEC**

A Organização Internacional para Padronização, ISO (*International Organization for Standardization*) foi fundada em 23 de fevereiro 1947 em Genebra, Suíça. Desde então, ISO publicou mais de 19.000 Normas Internacionais abrangendo quase todos os aspectos de tecnologia e negócios tais como segurança alimentar, computadores, agricultura, saúde, entre outros (ISO, 2012).

Algumas normas da ISO são de grande importância para a pesquisa.

- ISO 31 Tamanhos e unidades.
- ISO 1000 Unidades SI e recomendações para o uso de seus múltiplos e de algumas outras unidades.
- ISO 14000 - ISO 14064 Normas de gestão do ambiente em ambientes de produção.
- ISO/IEC 17024 Avaliação de conformidade para estabelecer requisitos gerais para organismos que realizam certificação de pessoas.
- ISO/IEC 17025 Laboratórios de Ensaio e Calibração (ISO, 2012).

## **2.3. Contexto Nacional**

### **2.3.1. INMETRO**

Para acompanhar o avanço tecnológico mundial, se criou, em 1973, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, o INMETRO, hoje chamado Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e



Tecnologia (Lei 5.966). O INMETRO atua como Secretaria Executiva do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO), colegiado interministerial, que é o órgão normativo do Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (SINMETRO) (INMETRO, 2012) (INMETRO, 2012b).

A missão do INMETRO é fortalecer as empresas nacionais, aumentando sua produtividade por meio da adoção de mecanismos destinados à melhoria da qualidade de produtos e serviços, prover confiança à sociedade brasileira nas medições e nos produtos, através da metrologia e da avaliação da conformidade, promovendo a harmonização das relações de consumo, a inovação e a competitividade do País. Dentre as suas competências e atribuições destacam-se (INMETRO, 2012c, 2012b, 2012):

- Executar as políticas nacionais de metrologia e da qualidade;
- Verificar a observância das normas técnicas e legais, no que se refere às unidades de medida, métodos de medição, medidas materializadas, instrumentos de medição e produtos pré-medidos;
- Manter e conservar os padrões das unidades de medida, assim como implantar e manter a cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida no País;
- Fortalecer a participação do País nas atividades internacionais relacionadas com metrologia e qualidade;
- Prestar suporte técnico e administrativo ao Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - CONMETRO;
- Fomentar a utilização da técnica de gestão da qualidade nas empresas brasileiras;
- Planejar e executar as atividades de acreditação de laboratórios de calibração e de ensaios, de provedores de ensaios de proficiência, de organismos de certificação, de inspeção, de treinamento e de outros;
- Desenvolvimento, no âmbito do SINMETRO, de programas de avaliação da conformidade, nas áreas de produtos, processos, serviços e pessoal, compulsórios ou voluntários, que envolvem a aprovação de regulamentos.

A Metrologia Química no Inmetro foi criada em junho de 2000 em função do reconhecimento da importância desta área para a competitividade dos produtos e serviços brasileiros. As principais competências da Divisão de Metrologia Química são (INMETRO, 2012d):

- Implantação de métodos primários e técnicas de alto valor metrológico para medições das diversas espécies químicas;
- Desenvolvimento de procedimentos de referência para determinação destas espécies;
- Desenvolvimento, produção e certificação de materiais de referência para medição das citadas espécies;
- Prestação de serviços de calibração e ensaios em áreas que não houver laboratórios capacitados;
- Disseminação da cultura metrológica através de palestras, seminários, cursos, participação em congressos e publicação de artigos em revistas especializadas;
- Participação em intercomparações internacionais;
- Coordenação de intercomparações nacionais;
- Representação do País em fóruns internacionais;
- Participação em comitês técnicos nacionais e internacionais;
- Coordenação de Ensaio de Proficiência.

O INMETRO publicou por primeira vez em 2002 o documento de caráter de orientações sobre a validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008 que esta atualizando), com objetivo de auxiliar os laboratórios de ensaios químicos, na validação dos métodos analíticos e os parâmetros para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (INMETRO, 2012a):

- DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04-Julho 2011: Orientações sobre validação de métodos analíticos.

### **2.3.2. ANVISA**

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, foi criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, e esta vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil. A ANVISA tem como área de atuação todos os setores relacionados a produtos e serviços (nacionais ou importados) que possam afetar a saúde da população brasileira. Essa Agência promove e protege a saúde da população e intervém minimizando os riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde, para a melhoria da qualidade de vida da população brasileira (ANVISA, 2012).

Para o caso de insumos farmacêuticos e indústria farmacêutica a ANVISA assegura a qualidade na produção de medicamentos e é responsável pela autorização de funcionamento dos estabelecimentos e pelo controle sanitário dos insumos farmacêuticos, mediante a realização de inspeções sanitárias e elaboração de normas. A ANVISA também implementa o cadastramento dos insumos farmacêuticos ativos para as empresas que exerçam as atividades de fabricar, importar, exportar, fracionar, armazenar, expedir, embalar e distribuir. As notificações de insumos farmacêuticos com desvios de qualidade comprovados também são avaliadas pela ANVISA (ANVISA, 2012a).

Para o caso de nosso interesse essa agência publicou a seguinte resolução:

- Resolução RE nº 899: Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003).

### **2.3.3. ABNT**

A ABNT foi criada em 1940 e é o órgão responsável pela normalização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. A ABNT é uma entidade privada, sem fins lucrativos, reconhecida como único Foro Nacional de Normalização através da Resolução n.º 07 do CONMETRO, de 24.08.1992 (ABNT, 2012).

A ABNT é membro fundador da ISO, da COPANT (Comissão Pan-americana de Normas Técnicas) e da AMN (Associação Mercosul de Normalização).

A ABNT é a representante oficial no Brasil das seguintes entidades internacionais: ISO, IEC (Internacional Eletrotechnical Commission); e das entidades de normalização regional COPANT e a AMN.

Para nosso caso os comitês técnicos importantes são:

- ABNT/CB-10 – QUÍMICA: A área de trabalho é a normalização no campo da química compreendendo produtos químicos orgânicos, produtos e preparados químicos diversos, no que concerne a terminologia, requisitos, métodos de ensaio e generalidades (ABNT, 2012).
- ABNT/CB-25 – QUALIDADE: A área de trabalho é a normalização no campo de gestão da qualidade, compreendendo sistemas da qualidade, garantia da qualidade e tecnologias de suporte; diretrizes

para seleção e aplicação das normas da qualidade; e no campo da avaliação da conformidade compreendendo estudo de meios para a avaliação da conformidade de produtos, processos, serviços e sistemas de gestão; elaboração de guias e normas relativas a práticas de ensaio, inspeção e certificação de produtos, processos e serviços e para avaliação de sistemas de gestão, laboratório de ensaio, organismos de inspeção, certificação e credenciamento, e sua operação e aceitação. Excluindo-se a normalização de produtos e serviços (ABNT, 2008) (ABNT, 2005) (ABNT, 2012a).

## 2.4.

### Validação intralaboratorial de método analítico por HPLC

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia, a Validação pode ser definida como uma verificação de requisitos específicos visando à adequação de um método para um uso pretendido (JCGM 200:2012). Essa avaliação dos parâmetros de validação possibilita a determinação das características de desempenho de um método analítico (IMETRO, 2012a) (ANVISA, 2003).

O processo de validação deve ser aplicado aos métodos não normalizados, aos métodos criados/desenvolvidos por um laboratório, aos métodos normalizados que são usados fora do escopo para os quais foram concebidos ou aos métodos normalizados que sofreram modificações (INMETRO, 2012d). Tanto a ANVISA quanto o INMETRO publicaram guias para a validação de métodos analíticos (Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, e o documento de orientação INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 07/2011). Há também procedimentos de validação que são estabelecidos por órgãos internacionais como a ISO (ISO 5725, 1994), a IUPAC (IUPAC - *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*, 2002) e pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH - Q2(R1) *Validation of analytical procedures: text and methodology*, 1994). Estes documentos têm como objetivo o de auxiliar laboratórios a mostrar que um determinado método atende as características necessárias de uma aplicação de modo a obter resultados com a qualidade requerida (IUPAC, 2012c, ISO, 2012).

A validação de métodos tem recebido considerável atenção em literaturas, comitês industriais e agências regulamentadoras, com grande procura por parte dos laboratórios e organismos acreditados por protocolos para planejamento e

controle de processos. No entanto, a diversidade de áreas de aplicação, de parâmetros de desempenho a serem avaliados, bem como a terminologia e definições, têm dificultando a harmonização dos processos de validação (Leão, 2000; Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, Documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 07/2011).

Um procedimento detalhado foi realizado para validação intralaboratorial do método desenvolvido, incluindo delineamento experimental, tratamento estatístico e avaliação das fontes de incertezas. A Tabela 1 mostra os parâmetros analíticos de desempenho que foram contemplados nesse trabalho.

Tabela 1: Parâmetros analíticos de desempenho (LEÃO, 2000).

Parâmetro	Operacionalidade/aspecto econômico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seletividade</li> <li>• Precisão</li> <li>• Tendência/recuperação</li> <li>• Robustez</li> <li>• Sensibilidade / linearidade / faixa de trabalho</li> <li>• Limite de detecção</li> <li>• Limite de quantificação</li> <li>• Incerteza de medição</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Investimento</li> <li>• Manutenção</li> <li>• Velocidade</li> <li>• Facilidade de uso</li> <li>• Simplicidade</li> </ul>

#### 2.4.1. Seletividade

A seletividade pode ser definida como a capacidade que o método possui de determinar certa substância (analito) na presença de outras que fazem parte da matriz da amostra como impurezas, produtos de degradação e outras substâncias concomitantes. A presença de substâncias que interfiram (interferentes) na determinação de um analito pode acarretar no aumento ou na redução do sinal medido, podendo ser a magnitude do efeito dependente também da concentração (INMETRO, 2011).

A seletividade pode ser avaliada de diversas formas, através da análise da pureza do sinal, análise de amostra de referência, comparação dos resultados obtidos em diferentes condições de medição, comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos de análise, análise da amostra sem a presença do analito de interesse, análise por método de adição de analito e comparação da inclinação da curva analítica obtida na presença dos potenciais interferentes

com a inclinação da curva de padrões puros (EUROCHEM, 1998; INMETRO, 2011).

Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrométrico de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA-RE-899-2003 2-1, 29, 2003).

#### 2.4.2. Resposta linear

A resposta linear do método indica que a relação entre a resposta medida e a concentração do analito é linear. Essa linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa sendo modelada como uma expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta (apresentação simplificada na Equação 23) é o modelo que relaciona as duas variáveis são (INMETRO, 2011; EUROCHEM, 2012):

$$y = a + bx \quad (23)$$

Onde:

y = resposta medida

x = concentração

a = interseção com o eixo y, quando x = 0

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade

Estabelecer a faixa de linearidade é um procedimento que deve ser feito a partir da construção de uma curva analítica com no mínimo cinco níveis de concentração, sendo três, o número mínimo de replicas. O coeficiente de correlação linear (r) pode ser utilizado nesta avaliação, sendo o valor mínimo aceitável igual a 0,99 (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003). O modelo é avaliado pela regressão linear, gráfico dos resíduos e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que indicam o quanto a reta pode ser considerada adequada nesse modelo matemático.

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo

dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de  $t$  por a Equação (24) (INMETRO, 2011):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{\frac{s_r}{\sqrt{n}}} \quad (24)$$

Onde:

resíduo =  $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$

$s_r$  = desvio padrão dos resíduos

$n$  = número de pontos

Quando o valor de  $t$  calculado para um ponto duvidoso de uma curva analítica for menor ou igual ao valor de  $t$  unilateral, para a confiança desejada e  $(n-1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta (EURACHEM, 2012).

### 2.4.3.

#### Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentrações do analito ou de valores de uma propriedade física no qual o método pode ser aplicado assumindo um modelo de resposta. Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem das propriedades físicas e químicas do material medido no nível de concentração elevado e do sistema de resposta do equipamento de medição.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a

avaliação da faixa de trabalho (Inmetro, 2011; EURACHEM, 2012; ANVISA, 2003).

#### 2.4.4.

##### Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) no caso de técnicas de separação é a concentração mais baixa da substância que pode ser detectada, na maioria dos casos visualmente e não por integração de sinal. A determinação do LOD é realizada por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (INMETRO, 2012; ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (LOQ) é a concentração mais baixa da substância que se consegue determinar com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais especificadas.

No entanto, enquanto que para o cálculo do LOD o fator de multiplicação é 3, para o cálculo de LOQ este fator deve ser alterado para 5, 6 ou 10 de acordo com a incerteza desejada (INMETRO, 2011).

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco ou do ruído. O LOD e o LOQ podem ser calculados pela Equação (25) e pela Equação (26), respectivamente:

$$\text{LOD} = x_b + 3s \quad (25)$$

$$\text{LOQ} = x_b + 10s \quad (26)$$

Onde:

$x_b$  é a média das áreas da menor concentração detectada

$s$  é o desvio padrão das medições de menor concentração

#### 2.4.5.

##### Tendência/Recuperação

Segundo o DOQ-CGCRE 008, exatidão de um método analítico é avaliada numericamente através da tendência. Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: (i) uso de materiais de



referência certificados (MRC), (ii) participação em comparações interlaboratoriais e (iii) realização de ensaios de recuperação.

A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como descrita na Equação (27):

$$\frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100\% \quad (27)$$

A recuperação do analito pode ser estimada pela determinação de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações ao longo da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é decorrente do fato de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação. A recuperação é calculada segundo Equação (28):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 + C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (28)$$

Onde:

$C_1$  é a concentração do analito na amostra fortificada,

$C_2$  é a concentração do analito na amostra não fortificada,

$C_3$  é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

#### 2.4.6.

#### Precisão

A precisão (INMETRO, 2011) representa o grau de repetição entre os resultados obtidos em diferentes análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes a uma amostra homogênea. Normalmente ela é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e

da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado conforme a Equação (29):

$$CV (\%) = DPR = \frac{s}{CMD} \times 100 \quad (29)$$

Onde:

s = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, de material de referência ou pela adição do analito a um ensaio em branco da amostra, em várias concentrações ao longo da faixa de trabalho. O número de replicas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório. As condições de repetibilidade podem ser caracterizadas utilizando o mesmo procedimento de medição, o mesmo observador, o mesmo instrumento usado sob mesmas condições e local e as repetições devem ser feitas num espaço de tempo curto.

A precisão intermediária pode ser definida como a concordância entre os resultados obtidos em um mesmo laboratório, utilizando o mesmo método, a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, porém definindo-se exatamente as condições que são diferentes tais como dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A precisão intermediária representa a variabilidade dos resultados em um laboratório. Nesse trabalho, a precisão intermediária foi calculada a partir de experimentos realizados em dias diferentes. Analisou-se a mesma solução padrão em três níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho (ponto logo acima do LOQ, ponto médio da curva, ponto superior da curva), sendo que para cada nível foram realizados cinco réplicas, em um intervalo de 1 h. O coeficiente de variação pode ser obtido a partir do desvio padrão da precisão intermediária, Equação (29), e da média das medições dos dias (INMETRO, 2011). Como foram efetuados ensaios em dias diferentes, utilizou-se a Equação (30).

$$Spi_{(jk)} = \sqrt{\frac{1 \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}{2t}} \quad (30)$$

Onde:

$y_{j1}$  = resultado médio obtido para a amostra  $j$  no primeiro dia;

$y_{j2}$  = resultado médio obtido para a amostra  $j$  no 3º dia.

$t$  = total de amostras ensaiadas;

$n$  = total de ensaios efetuados por amostra;

$j$  = nº da amostra,  $j = 1, t$ ;

$k$  = nº do ensaio da amostra  $j$ ,  $k = 1, n$ .

Utilizou-se o teste F baseado no princípio da análise de variância (ANOVA), de modo a verificar qualquer diferença significativa entre as variâncias das análises obtidas em dois dias diferentes. O valor de F é obtido a partir da Equação (31) (Skoog *et al.*, 2005; Lanças, 2009):

$$F = \frac{MQF}{MQE} \quad (31)$$

Onde:

MQF é a soma das médias quadráticas entre dias e MQE a soma das médias quadráticas de cada dia.

Verifica-se se há diferença significativa entre as variâncias das análises realizadas quando o  $F_{\text{calculado}}$  for menor que  $F_{\text{crítico}}$  para todos os níveis. Compara-se também a média dos resultados obtidos a partir do estudo da precisão intermediária pelo teste t.

#### 2.4.7.

#### **Avaliação da aceitabilidade das características de precisão de um método de análise**

No caso de não haver método com os quais possam ser comparadas as características de precisão, os valores teóricos de precisão podem ser calculados a partir da função de *Horwitz* que é uma equação de precisão generalizada independente do analito e da matriz, sendo dependente apenas da

concentração para a maioria dos métodos de análise de rotina, Equação (32), (INMETRO, 2011):

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (32)$$

Onde:

C é a fração em massa do componente analisado.

Em condições de repetibilidade o valor de HorRat, Equação (33), pode ser obtido a partir do CV(%) dividido pelo  $RSD_R$  estimado, o qual está entre 1/2 a 2/3 de  $RSD_R$ .

$$HorRat = \frac{CV(\%)}{\frac{2RSD}{3}} \quad (33)$$

Os valores, que são independentes da matriz da amostra, encontram-se na Tabela 2:

Tabela 2: Principais valores de Horwitz (INMETRO, 2011).

Razão de concentração	$RSD_R$
1 (100%)	2
$10^{-1}$	2,8
$10^{-2}$ (1%)	4
$10^{-3}$	5,6
$10^{-4}$	8
$10^{-5}$	11
$10^{-6}$ (ppm)	16
$10^{-7}$	23
$10^{-8}$	32
$10^{-9}$ (ppb)	45

#### 2.4.8. Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método é considerado robusto se este revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2011).

Em HPLC, as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, concentração de tampão, temperatura, fluxo, volume de injeção, proporção da fase móvel, pH do tampão, concentração do tampão.

#### **2.4.9.**

#### **Comparação da precisão entre métodos**

A comparação da precisão entre métodos possibilita verificar o grau de proximidade que existe entre os resultados obtidos pelos dois métodos. A comparação é realizada por meio de análises de uma mesma amostra utilizando o método desenvolvido e um método de referência (INMETRO, 2011a). Aplica-se o teste t para comparar as médias dos resultados e o teste F para comparar as variâncias.

#### **2.5.**

#### **Estimativa da incerteza de medição**

De acordo com o VIM (2012) o termo incerteza de medição é o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. O conhecimento da incerteza é importante já que o mesmo implica em uma maior validade dos resultados de uma medição (EURACHEM, 2002; JCGM 200:2012).

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 os laboratórios devem avaliar a incerteza de suas medições, além de divulgar a incerteza de medição em circunstâncias específicas, quando as mesmas forem relevantes para interpretação do resultado do ensaio. Observam-se na prática várias fontes que contribuem para a incerteza em uma medição, entre as quais: a definição incompleta de um mensurando, amostragem não representativa, homogeneidade da amostra, estabilidade da solução, pesagem, efeitos de matriz e interferências, equipamentos volumétricos, erro de tendência pessoal na medição de instrumentos analógicos, resolução finita do instrumento, entre outros (INMETRO, 2011; EURACHEM, 2002).

As etapas necessárias para o cálculo da incerteza de medição segundo o ISO GUM são:

- (i) especificar o mensurando: especificação do mensurando para o método analítico e uma descrição completa dos diferentes estágios do método analítico pela equação do mensurando;

(ii) identificar todas as fontes de incerteza possíveis para cada variável utilizada. Para isso pode ser feita a utilização do diagrama de causa e efeito;

(iii) definir as incertezas das grandezas de entrada (Incertezas Padrão) – definir os tipos de incertezas A e B, do seguinte modo:

- Incerteza tipo A: o método de avaliação consiste na análise estatística de uma série de observações e a incerteza pode ser caracterizada pelos desvios-padrão experimentais (JCGM 200:2012; JCGM 100:2008). Logo, a dispersão em torno do valor médio pode ser expressa pela Equação (34) (INMETRO, 2003; EURACHEM, 2012):

$$u_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (34)$$

Onde:

$u_{\bar{x}}$ : Incerteza padrão da estimativa do valor médio.

S: Desvio padrão calculado.

$\sqrt{n}$ : Raiz quadrada do número de duplicatas (n).

Como geralmente o número de duplicatas é reduzido, utiliza-se o coeficiente *t-Student* que leva em conta o fato de a amostragem ser pequena e permite a estimação da incerteza tipo A, mesmo para baixos valores de n (INMETRO, 2003).

Assim para um determinado nível de confiança, a incerteza de medição tipo A ( $u_A$ ) é dada pela Equação (35):

$$u_A = t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (35)$$

Incerteza tipo B: é obtida por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações. Pode ser caracterizada pelos desvios-padrão estimada por distribuições de probabilidades assumidas, baseadas na experiência ou são determinadas a partir de informações acessórias e externas ao processo de medição. Este conjunto de informações inclui: dados do fabricante, dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados, incertezas atribuídas a dados de referência extraídos de manuais etc. (INMETRO, 2003).

Pode-se citar como exemplo de incerteza tipo B a extraída de um certificado de calibração, dada pela Equação (36).

$$u_B = \frac{U_{(declarada)}}{k} \quad (36)$$

Onde:

$u_B$ : Incerteza padrão do tipo B;

$U_{(declarada)}$ : Incerteza expandida obtida a partir do certificado e;

$k$ : Fator de abrangência, que depende do nível de confiança.

Tanto na incerteza tipo A quanto na do tipo B, a incerteza padrão é a incerteza de uma medição expressa como um desvio padrão, devendo-se expressar todas as componentes de incerteza correspondentes a um desvio padrão. No entanto na incerteza tipo B assumindo que cada grandeza de entrada (resultado) tem uma distribuição e um intervalo de confiança, a incerteza deve ser calculada com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular, triangular) correspondente a um nível de confiança declarado. A Tabela 3 apresenta os divisores para algumas distribuições de probabilidade.

Tabela 3: Divisores para algumas distribuições de probabilidade

Distribuição	Divisor
Normal (Certificado de calibração)	$k (\sim 2)$
Retangular	$\sqrt{3}$
Triangular	$\sqrt{6}$

(iv) calcular da incerteza padrão combinada: expressar todas as incertezas quantificadas em termos de desvio padrão e combiná-las segundo as regras de operação de variâncias. Os efeitos aleatórios de cada fonte de incerteza devem ser considerados para compor a chamada incerteza padrão combinada. Para que a estimativa da incerteza padrão combinada seja efetuada de forma correta, assume-se a independência entre essas fontes de modo a se usar a forma mais simples da lei da propagação da incerteza (soma quadrática das contribuições) como indicado na Equação (37).

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u_{x_i}^2} \quad (37)$$

Onde:

$u_c$ : Incerteza padrão combinada;

$\frac{\partial y}{\partial x_i}$ : Coeficiente de sensibilidade de cada fonte (coeficiente estes utilizados para

transformar grandezas de entrada em incerteza, uniformizando as unidades das grandezas de entrada de modo permitir que estas possam ser combinadas ao final do processo);

$u_{x_i}^2$ : Incerteza padrão associada a cada uma das fontes.

(v) avaliação dos graus de liberdade efetivos ( $v_{eff}$ ): utilizando a distribuição “*t-Student*”. Quando as incertezas padrão de várias fontes de incertezas são consideradas para estimar a incerteza padrão combinada, o número de graus de liberdade resultante da incerteza combinada deve ser estimado a partir de informações da cada fonte de incerteza. Logo o número de graus de liberdade efetivos é o número de graus de liberdade associado à incerteza padrão combinada. Este é obtido a partir da equação de Welch-Satterthwaite (Equação (38)):

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (38)$$

Onde:

$v_{eff}$ : número de graus de liberdade efetivos associado à incerteza padrão combinada,

$u_c$ : incerteza combinada,  $u_i$  é a incerteza padrão associada a i-ésima fonte de incerteza,

$v_i$ : n° de graus de liberdade associado a i-ésima fonte de incerteza,

$N$ : n° total de fontes de incertezas analisadas.



(vi) determinar a incerteza expandida, a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada  $u_c(y)$  por um fator de abrangência  $k$ , conforme a Equação (39).

$$U = k_{v,p} u_c(y) \quad (39)$$

O fator de abrangência  $k$  deve ser sempre declarado. Quando se tem um número elevado de medições utiliza-se como regra geral  $k=2$  para expressar a incerteza expandida. Desse modo, a incerteza expandida corresponde a uma probabilidade de abrangência de 95,45% (considerando distribuição normal), por se tratar de caráter amostral. O fator “ $k$ ” se relaciona diretamente com o grau de probabilidade de acerto do cálculo da incerteza. O valor do fator de abrangência  $k$  deve levar em conta, além do nível de confiança desejado, o número de graus de liberdade efetivos associados ao caso para o intervalo  $y-U$  a  $y+U$ . Em geral o valor de  $k$  se encontra entre 2 e 3, porém em aplicações especiais pode assumir outros valores. A Tabela 4 relaciona o fator de abrangência  $k$  a um nível de confiança, assumindo-se uma distribuição normal (JCGM 100:2008).

Tabela 4: Relação entre o nível de confiança e o fator de abrangência em uma distribuição normal.

Nível de confiança (%)	Fator de abrangência (k)
68,27	1,000
90,00	1,645
95,00	1,960
95,45	2,000
99,00	2,576
99,73	3,000

O resultado de uma medição pode ser expresso conforme Equação (40):

$$Y = y + U \quad (40)$$

Este resultado pode ser interpretado como a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando  $Y$  é  $y$ , e que  $y - U$  a  $y + U$  é o intervalo com o qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a  $Y$  (JCGM 100:2008). Este intervalo pode ser definido como  $y - U \leq Y \leq y + U$ .

## 2.6.

### Estudos de homogeneidade e de estabilidade

Em teoria, um material é perfeitamente homogêneo em relação a uma determinada propriedade, se não existir qualquer diferença significativa entre os valores desta propriedade nas diferentes partes do material. No entanto, na prática, um material é considerado homogêneo em relação a uma determinada propriedade, se a diferença entre os valores desta propriedade entre as diferentes porções do material é desprezível se comparada com uma das componentes de incerteza do material como um todo. Se a matriz em questão é uma solução ou um material aparentemente puro, o estudo de homogeneidade é necessário para comprovar a homogeneidade e para detectar possíveis falhas no processo de preparação. Mas se a matriz em questão for heterogênea, o estudo de homogeneidade é necessário para estimar o grau de não-homogeneidade (CUNHA, 2007).

A ISO Guide 35: 2008 não estabelece um número mínimo de amostras (no caso do *pool* de formulações farmacêuticas) para um estudo de homogeneidade. O guia recomenda que este número seja entre 10 e 30, mas não menor do que 10. No entanto, a norma também ressalta que o número de amostras escolhidas para o estudo de homogeneidade depende do tamanho de lote, devendo ser representativo de todo o lote, considerando a abordagem estatística a ser utilizada.

O tratamento estatístico adotado foi o de comparação de médias, teste *t-Student*, avaliando as amostras individualmente e em um *pool*, neste caso de amostras de formulações farmacêuticas.

Assim como a avaliação de homogeneidade, o estudo de estabilidade é de extrema importância e tem como objetivo determinar o grau de instabilidade de um material candidato a ser um material de referência ou confirmar a estabilidade de um material a ser analisado (ISO GUIDE 35:2008). Mesmo um material considerado estável pode apresentar instabilidade para uma ou mais propriedades. Os estudos de estabilidades podem ser de curta e longa duração, também conhecidos como isócrono e clássico, respectivamente.

O tratamento estatístico utilizado foi o de ANOVA, avaliando num intervalo de horas e dias a solução do ciclofenil após tratamento UV.

### 3

## Materiais e métodos

Neste capítulo é apresentada a metodologia utilizada para o desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detector de fluorescência, para quantificação do ciclofenil de forma indireta após derivação fotoquímica.

### 3.1.

#### Reagentes

Para a preparação das soluções estoque dos padrões do analito e das amostras medicamento foi utilizado metanol grau HPLC (Tedia, Brasil) e água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) obtida de um purificador Milli-Q (Millipore, EUA). O ciclofenil utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). Para os testes de dosagem foi usado o medicamento Menopax® (200 mg por comprimido), para administração oral (Aché, Brasil).

Tetraborato de sódio, ácido nítrico e hidróxido de sódio forma adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

### 3.2.

#### Materiais descartáveis e vidraria

Os filtros de seringas utilizados para filtrar as amostras (17 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro do poro) foram adquiridos da National Scientific Company (Reino Unido). Para filtração dos solventes, aquoso e orgânico, foram utilizados filtros de membranas, tamanho de poro de 0,22 µm e de 47 mm de diâmetro, adquiridos da Fiber filter/Tokyo Soshi Kaisha Ltda (Japão).

Os tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura) foram feitos sob medida pela empresa (Qualytá, Brasil). Seringas descartáveis de 3 mL (Med Inject, Brasil) foram usadas conectadas aos filtros de seringa para a filtração das amostras e conectadas à agulhas de aço inox sem ponta para injeção manual no cromatógrafo.

Balões volumétricos de 10 mL foram calibrados no laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração (RBC), no caso o Laboratório de

caracterização de fluídos (LCF/PUC-Rio). Os certificados encontram-se em anexo (anexo I).

### **3.3. Instrumentação**

#### **3.3.1. Reator Fotoquímico**

A equipe do laboratório LEEA-PUC-RIO desenvolveu e construiu um protótipo de reator fotoquímico UV-vis com a finalidade de realizar reações de fotoderivação química. O reator é composto de seis lâmpadas germicidas de vapor de mercúrio (6 W cada) com linhas emitidas nos intervalos de comprimento de onda entre 296-313 nm, uma mesa de notebook com ventilador (Nylon, China) de 3010 RPM e fluxo de ar de 38,6 CFM (pés cúbicos de ar por minuto por pé quadrado, unidade americana fora do SI, e 3,84 W), 6 reatores de 9 Watts (ECP, Brasil) (cada um com suporte para 1 lâmpada fluorescente), O sistema foi montado em uma seção de tubo de PVC de 0,22 m de diâmetro interno, 0,30 m de largura (Figura 10).

A mesa com ventilador foi colocada em um dos extremos do tubo (fundo do reator) para um melhor resfriamento do sistema (ver Figura 10B para a visualização do sentido do fluxo de ar), evitando assim grande variação de temperatura das amostras causada pelo aquecimento natural das lâmpadas. Para controlar a exposição das amostras ao UV, as lâmpadas foram ligadas em pares (como mostrado na Figura 10 C, D e E), podendo cada par ser ligado independentemente um do outro, como mostra o diagrama do circuito elétrico do reator (Figura 10A). As soluções, por causa do fluxo de ar dentro do sistema, saiam do reator com a temperatura em torno de 20 °C.

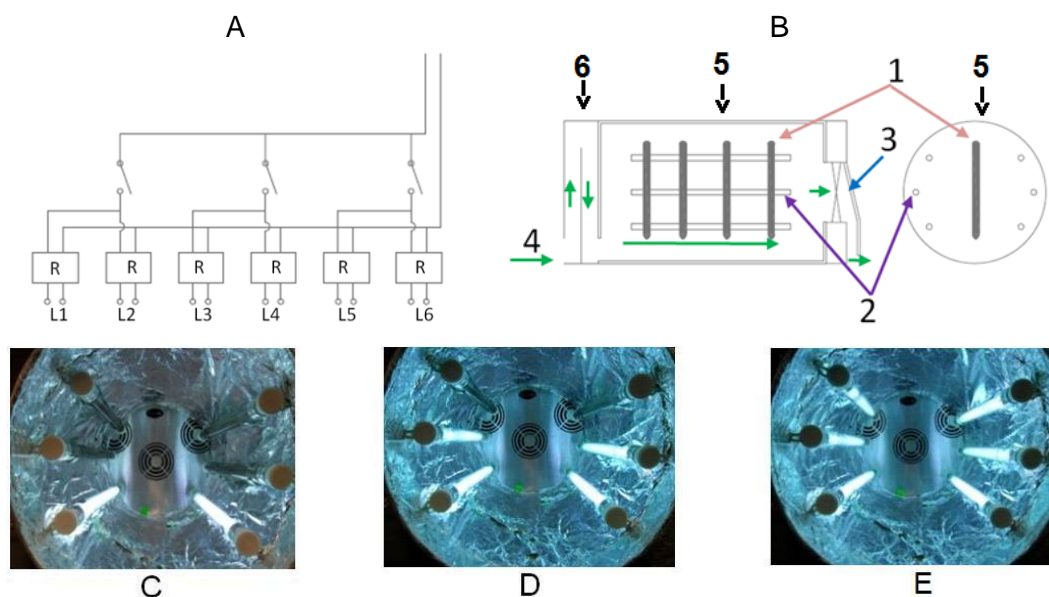


Figura 10: Esquema e foto do reator fotoquímico: (A) diagrama do circuito elétrico do reator onde R é reator de 9 W e L1 - L6 são as lâmpadas germicidas; (B) diagrama do fotoreator já montado onde: (1) são os tubos de quartzo que contém as amostras, (2) lâmpadas germicidas, (3) extrator de ar (mesa com ventilador de notebook), (4) sentido de fluxo do ar (entrada de ar ao foto reator), (5) tubo de PVC de 0,22 m de diâmetro interno x 0,30 m, (6) tampa do fotoreator (que tem um anteparo para evitar a saída de luz UV do fotoreator); (C) interior do fotoreator com duas lâmpadas ligadas; (D) interior do fotoreator com quatro lâmpadas ligadas e (E) interior do fotoreator com seis lâmpadas ligadas.

### 3.3.2. Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência

O cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (Waters modelo Breeze 1525, EUA) utilizado nessa pesquisa (Figura 11) contém uma bomba binária, um forno, e um detector de fluorescência multicanal. O software de controle é da Waters (Breeze system). A bomba binária de alta pressão permite variação da vazão de fase móvel de até  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . O forno utilizado permite ajustar a temperatura da coluna entre 20 a  $60^\circ\text{C}$ . O detector de fluorescência (Waters, modelo 2475) opera com até dois canais para monitorar a fluorescência. A excitação é feita com lâmpada de xenônio. O monocromador pode ser ajustado na faixa entre 200 e 900 nm. O sistema de injeção foi manual (Reodyne) com loop de  $20 \mu\text{L}$ .

Para a separação utilizou-se uma Coluna C18 Xterra de base polimérica (Waters) de 4,6 mm de diâmetro interno,  $5 \mu\text{m}$  de diâmetro médio da partícula e 150 mm comprimento.



Figura 11: Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters 1525) com (a) detector de fluorescência modelo 2475, (b) bomba binária de alta pressão, (c) forno, (d) foto interna das bombas binárias de alta pressão e (e) foto interna do forno.

### 3.3.3. Equipamentos auxiliares

O banho ultrassônico (modelo USB 214, CTA do Brasil) foi utilizado para auxiliar na homogeneização das amostras e para eliminação de gás dissolvido da fase móvel. A balança analítica (modelo AUW220D, Shimadzu, Japão) de cinco casas decimais foi calibrada por um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (SJS Serviços LTDA). O certificado de calibração encontra-se em anexo (anexo II). O pHmetro (TecnoPON MPA 210) utilizado possui um eletrodo combinado de vidro cuja referência interna é um eletrodo de Ag/AgCl.

As micropipetas usadas foram de volume ajustável (faixas entre 0,20 e 100  $\mu\text{L}$  e de 100 e 1000  $\mu\text{L}$ ) da marca HT, calibradas por um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (LCF/PUC-Rio) e os certificados encontram-se em anexo (anexos III).

### 3.4. Procedimento

#### 3.4.1. Lavagem do material

O material usado foi lavado primeiramente com água da torneira, em seguida com água destilada e por último, o material foi imerso em solução de ácido nítrico 10% por 24 h. Depois desse tempo o material foi enxaguado com água destilada e posteriormente com água ultrapura. Quando necessário, um detergente (Extran®, Merck) foi usado.

#### 3.4.2. Preparo do padrão do analito e das amostras de medicamentos

O tampão borato foi preparado a partir de uma solução de tetraborato de sódio  $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . O valor do pH da solução foi ajustado para 10,0 com adição de uma solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio.

Preparou-se a solução estoque de ciclofenil de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em metanol. As soluções padrões foram preparadas por diluição sequencial da solução estoque com uma mistura de metanol/tampão borato (pH 10,0) cuja proporção é 60/40% v/v. A curva analítica foi preparada transferindo pequenas alíquotas da solução estoque em balões volumétricos de 10,0 mL. Da mesma forma, uma mistura de metanol/tampão borato foi utilizada para ajustar o volume do balão, obedecendo à proporção final de 60/40% v/v.

As soluções das amostras de medicamento (Menopax) foram feitas com a maceração de um conjunto de comprimidos. A fim de se tornar mais significativo, sete comprimidos foram colocados em um gral de porcelana e triturados com auxílio de um pistilo. Depois, uma massa conhecida (0,00291 g) foi dissolvida em metanol. A solução permaneceu no ultrassom por 5 min para forçar a dissolução completa do fármaco. Ajustou-se a um volume de 50 mL. A solução foi filtrada com auxílio de um filtro de seringa e filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Desta solução foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 10,00 mL e diluídas com a mistura de metanol/tampão borato (pH 10) 60/40% (v/v) para a concentração desejada.

### 3.4.3. Tratamento fotoquímico

As soluções de padrão ciclofenil e de medicamento, preparados em tampão borato (pH 10), foram colocadas em tubo de quartzo e expostas a radiação UV, no reator fotoquímico como mostra na Figura 12, em geral por um intervalo de tempo de 15 min. Depois de retirada a solução do reator (Figura 13), as mesmas foram guardadas no escuro até serem injetadas no cromatógrafo.

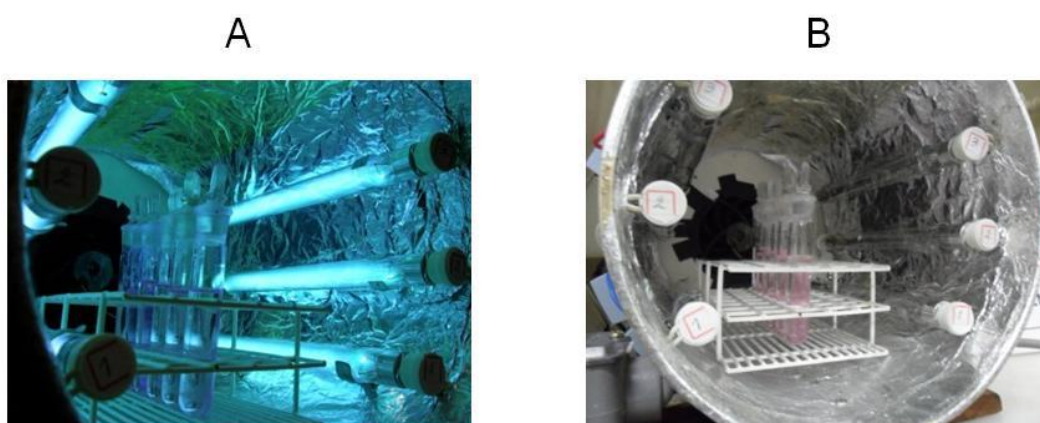


Figura 12: Amostras do ciclofenil no reator fotoquímico, (A) foto do reator ligado com as amostras, (B) foto do reator desligado com as amostras após 15 min.



Figura 13: Amostras de ciclofenil após exposição ao UV por 15 min.

### 3.4.4. Quantificação indireta do ciclofenil

As medições foram feitas utilizando cromatógrafo de fase móvel líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e com coluna C18. A fase móvel



consistiu em uma mistura de metanol/tampão borato 60/40% v/v. A eluição foi isocrática (composição constante de fase móvel) com a temperatura do forno constante (35 °C). A vazão de fase móvel foi 1 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de amostra foi 20 µL. Durante a otimização do método, a fluorescência foi acompanhada em dois canais simultaneamente cujos pares de comprimentos de onda foram 278/308 nm para a detecção simultânea de todos os fotoderivados do ciclofenil e 308/340 nm para o ciclofenil. Na determinação indireta do ciclofenil pela medição de sinal do fotoproduto III, a fluorescência foi medida em 328/374 nm que correspondem aos comprimentos de onda máximo das bandas de excitação e de emissão desse fotoderivado.

## 4

## Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento e validação do método cromatográfico para a determinação de ciclofenil após derivação fotoquímica.

### 4.1.

#### Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas

O desenvolvimento e a otimização dos parâmetros da cromatografia líquida visaram primeiramente o isolamento do ciclofenil original dos seus fotoderivados com o intuito de se obter um pico para a espécie fotoderivada mais estável e, com isso, se gerar condições mais robustas para a determinação indireta do analito. O procedimento de separação também visou proporcionar (em aplicações futuras) condições para a determinação de resíduos de ciclofenil em fluidos biológicos, já que a separação cromatográfica eliminaria os problemas de interferência espectral encontrados por Pacheco *et al.* (2008) quando da aplicação do método espectrofluorimétrico, usando derivação fotoquímica, na determinação indireta de ciclofenil em urina.

#### 4.1.1.

##### Testes de solubilidade

O ciclofenil é um composto de baixa polaridade e possui maior solubilidade em solventes menos polares que a água. Dessa forma, a escolha do sistema de solventes é crucial na etapa de preparação da amostra e na separação cromatográfica já que este deve ser compatível com a fase móvel escolhida. Inicialmente tomaram-se como referência os trabalhos de Pacheco *et al.* (2005, 2008). Nesses dois trabalhos, a derivação fotoquímica atingiu os melhores rendimentos em tampão Britton Robson (pH 10,8;  $40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Como esse pH é muito elevado para as condições do sistema cromatográfico utilizado, decidiu-se por alterar o tampão a fim de poupar, em especial, a coluna cromatográfica. O tampão escolhido foi o borato, que é um sistema de tampão que cobre a faixa de pH entre 9 e 10. A concentração do tampão foi reduzida de

$40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (indicado em Pacheco et al., 2008) para  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , de forma a se minimizar a chance de precipitação de cristais de sal no sistema cromatográfico.

Nos testes de solubilidade iniciais foram usadas as seguintes proporções de metanol/tampão borato (pH 10,  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ): 10/90%, 20/80%, 30/70%, 40/60%, 50/50%, 60/40%, 70/30%, 80/20% v/v. A concentração de ciclofenil utilizada foi de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Observou-se que o ciclofenil somente se solubilizou totalmente nos sistemas que continham mais de 40% de metanol. Optou-se então por trabalhar em 60% de metanol para garantir um excesso de segurança de modo a manter o analito em solução.

#### 4.1.2.

##### **Estudo da composição da fase móvel**

Para a otimização da composição da fase móvel utilizou-se soluções de ciclofenil de concentração igual  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  que foram expostas ao UV por 20 min. Com esse tempo de exposição ao UV, se observam sinais significativos dos fotoderivados do ciclofenil no par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 278/308 nm. Por outro lado nesse par de comprimentos de onda não se consegue observar o sinal original do ciclofenil. Vale salientar que Pacheco *et al.* (2008) mostrou que quando submetido a exposição ao UV o ciclofenil gerou dois fotoderivados.

Nos cromatogramas obtidos no presente trabalho, foram detectados a fluorescência de três aqui denominados de fotoderivado I, fotoderivado II e fotoderivado III (Figura 14). Este fato nos permite, a princípio, dizer que o mecanismo proposto por Pacheco *et al.* (2008) está incompleto, já que a presença de um dos fotoderivados foi ignorada. A não detecção do fotoderivado I foi provavelmente devido ao fato deste se degradar rapidamente com a exposição ao UV (ver mais adiante no subitem 4.1.3), não sendo detectado após 30 min de irradiação. Por outro lado, as condições de derivação fotoquímica e/ou de monitoramento utilizada por Pacheco *et al.* (2008) poderiam ter influenciado no resultado, minimizando a produção do fotoderivado I ou não permitindo a sua detecção. Podem-se citar algumas condições que Pacheco utilizou e que diferem das estabelecidas para o presente trabalho: (i) uso de outro reator UV com uma câmera interna maior e por isso com diferentes condições de irradiância, (ii) temperatura interna do reator maior (60°C), (iii) o par de comprimentos de onda

de excitação/emissão de monitoramento foi 290/410 nm, (iv) tempo de exposição mais longo (2 h) e (v) valor do pH da solução reacional maior o que 10.

Nos cromatogramas obtidos, em algumas ocasiões, pequenos picos também são observados em tempos de retenção variados, porém a presença destes foi atribuída a impurezas ou outros produtos de degradação que se formam em quantidades insignificantes ao longo do processo. Como essa etapa de otimização foi realizada com o medicamento contendo ciclofenil (de modo a se poupar o padrão para a validação) acreditou-se que vários dos pequenos picos são advindos de impurezas.

O estudo para definir a proporção ideal do metanol na fase móvel contendo o tampão borato (pH 10;  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi feito de modo univariado, avaliando o efeito do aumento da proporção de metanol (entre 60 e 70%). Em proporções entre 60 e 70% de metanol, se observou a separação dos picos dos fotoderivados do ciclofenil em zonas distintas, como mostrado na Figura 14. Para continuidade dos testes optou-se por utilizar a proporção de 60% de metanol onde se tem a melhor separação (de linha base) entre os três picos. Vale salientar que os picos dos derivados do ciclofenil apresentam uma frente que aparenta ser de espécies ainda não resolvidas. Esse efeito pode também ser advindo de condições de separação ainda não completamente ajustadas e que afetam as condições de partição dessas espécies entre a fase móvel e a fase estacionária ou causada por pequenos defeitos na fase estacionária que possibilitam uma fração eluída em tempo um pouco mais curto que a da zona principal. Independentemente disso, o pico do fotoderivado III (o produto final da derivação, como se mostrará adiante) aparece bem resolvido e simétrico. Como esse pico foi o escolhido para a determinação indireta do ciclofenil após derivação fotoquímica, o bom perfil deste é o que importou no trabalho.

A ordem de eluição dos fotoderivados do ciclofenil após exposição ao UV seguiu a ordem esperada, segundo as estruturas propostas por Pacheco *et al.* 2008, iniciando pelo fotoderivado III, a espécie mais polar e por isso a que tem menor tempo de retenção, seguido pelo fotoderivado II, que é menos polar. O fotoderivado I, a espécie que tem o maior tempo de retenção e não identificada no trabalho citado, seria a menos polar. Essa ordem de eluição é mais um resultado experimental que corrobora, em parte, a proposta de Pacheco *et al.* (2008) para as estruturas e mecanismo de formação dos fotoderivados.

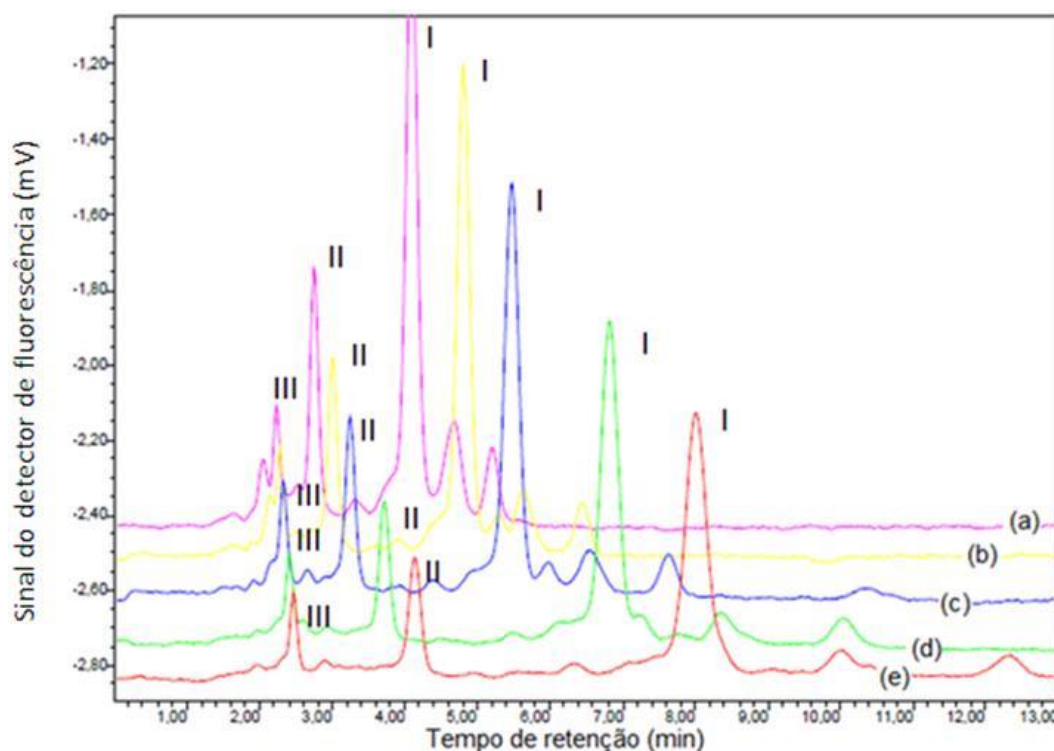


Figura 14: Cromatogramas de uma solução  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil usando proporções de metanol/tampão borato (pH 10;  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) v/v na fase móvel iguais a: (a) 70%/30%; (b) 67%/33%, (c) 65%/35%, (d) 62%/38%, (e) 60%/40%.

Para o estudo da concentração do tampão borato (pH 10) se testou duas concentrações,  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com um incremento de área quando a concentração do tampão foi a maior (Figura 15). Observou-se que para a menor concentração de tampão, os tempos de retenção dos fotoderivados do ciclofenil aumentaram e as áreas desses picos diminuíram em torno de 30% em relação ao observado com o uso da concentração de  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de tampão. Além disso, houve um aumento do ruído na linha de base do cromatograma. Dessa forma, optou-se para continuidade dos experimentos com a concentração do tampão igual a  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

A fim de se definir o melhor pH da fase móvel para se realizar a análise das amostras contendo ciclofenil, testou-se soluções do tampão borato ( $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) na faixa entre 9 e 11. Os resultados indicaram que o sinal de fluorescência do fotoderivado III (Figura 16) foi mais elevado em pH 10,5 o que condiz com os resultados dos estudos realizados por Pacheco et al. (2008), que definiu como pH ideal o valor de 10,8. No caso de Pacheco et al., o valor de pH 10,8 permitiu um melhor sinal para determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil (o sinal naquele caso foi a da banda que continha contribuições de fluorescência de todos os fotoderivados). O valor de pH escolhido para o

presente trabalho foi 10, porque se encontra na faixa de trabalho útil do tampão borato (7,8 a 10,2) e está abaixo do limite recomendado de compatibilidade com a coluna cromatográfica (C18 XTerra), cujo limite máximo de pH é 11.

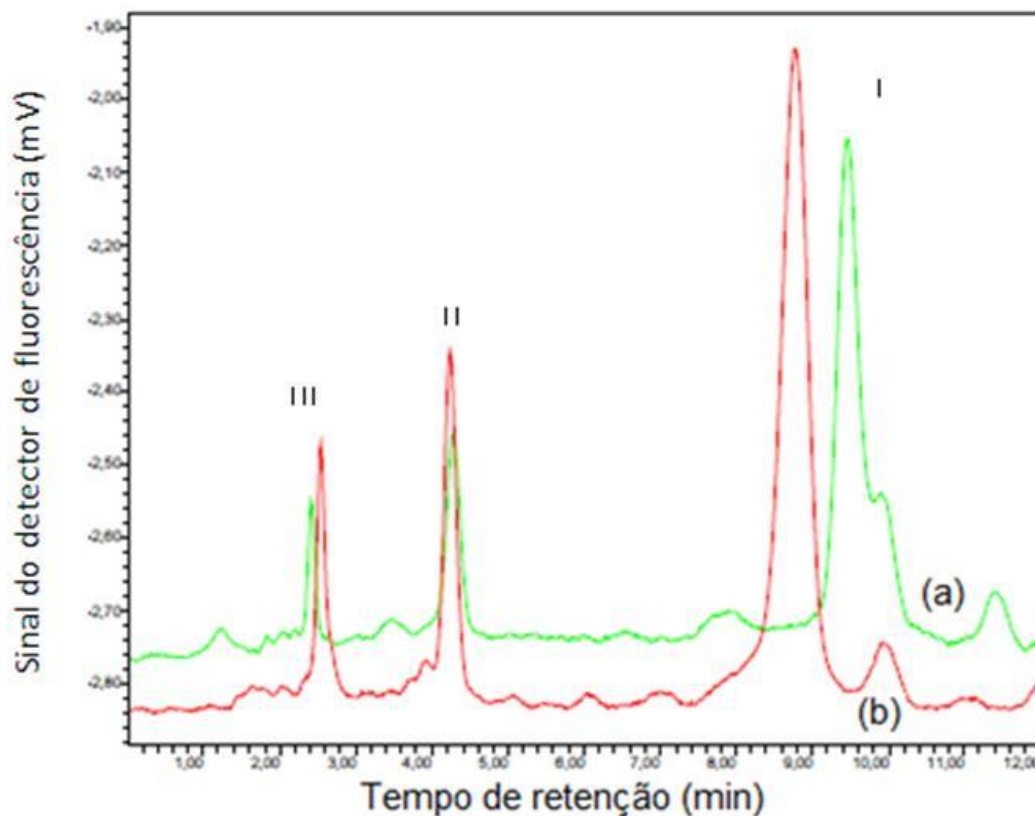


Figura 15: Cromatograma de solução de ciclofenil de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (a) tampão de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , (b) tampão de  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

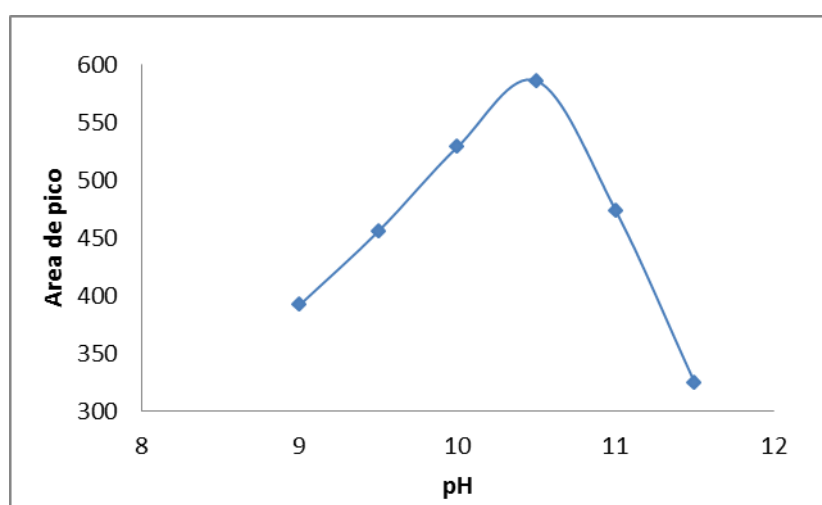


Figura 16: Efeito do valor do pH do tampão no sinal de fluorescência do fotoderivado III do ciclofenil (originalmente na concentração de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Fase móvel contendo metanol/tampão borato  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  60/40% v/v.

### 4.1.3.

#### Otimização da derivação fotoquímica

Como mencionado, o sistema de solventes escolhido para a preparação da solução para derivação fotoquímica do analito foi o metanol/tampão borato (pH 10;  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  60/40% v/v), cuja composição é a mesma da fase móvel utilizada na separação. Tal escolha foi feita para facilitar a compatibilidade entre a solução de amostra e fase móvel.

O primeiro estudo foi o da eficiência de reação em função da variação do número de lâmpadas (duas, quatro e seis lâmpadas) utilizadas no processo de derivação fotoquímica (20 min) do ciclofenil ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Conforme os resultados obtidos, a maior eficiência foi obtida com seis lâmpadas, como mostrado na Figura 17. Vale ressaltar que o uso do sistema de ventilação permitiu que as temperaturas de reação em todos os casos fosse a mesma (em torno de 20°C) independentemente do número de lâmpadas ligadas, o que minimizou a influência da variação de temperatura nesse estudo comparativo.

Para avaliar o perfil temporal de formação dos fotoprodutos do ciclofenil, uma solução do analito, de concentração de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , foi exposta ao UV no reator. Alíquotas da solução foram retiradas a cada 5 min de exposição ao UV até o tempo máximo de 90 min. Depois de retiradas, cada alíquota foi mantida no escuro por 10 min antes de ser injetada no cromatógrafo. O perfil de intensidade dos sinais de fluorescência dos derivados do ciclofenil em função do tempo de exposição ao UV pode ser observado na Figura 18. Comparando os três perfis, observa-se que tanto o fotoderivado I quanto o fotoderivado II do ciclofenil são formados imediatamente após a solução ser exposta ao UV. No entanto, seus sinais de fluorescência diminuem rapidamente com o tempo de exposição com a consequente formação do fotoderivado III, que por sua vez, possui um perfil temporal mais longo, fotodegradando-se lentamente, ao contrário dos dois outros fotoderivados, cujos sinais desaparecem completamente após 30 min no reator. Com 30 min de exposição ao UV, tem-se o sinal máximo do fotoderivado III. Com tempos de exposição maiores que 30 min, o sinal do fotoderivado III começa a diminuir lentamente indicando degradação do mesmo com formação de espécies não fluorescentes nos pares de excitação/emissão escolhidos para o monitoramento. Essa queda gradativa de sinal indica também certa estabilidade para o fotoderivado III quando irradiado no intervalo entre 20 e 30 min. Os resultados desses experimentos indicaram a escolha lógica do

fotoderivado III (mais estável) para se realizar a quantificação indireta de ciclofenil.

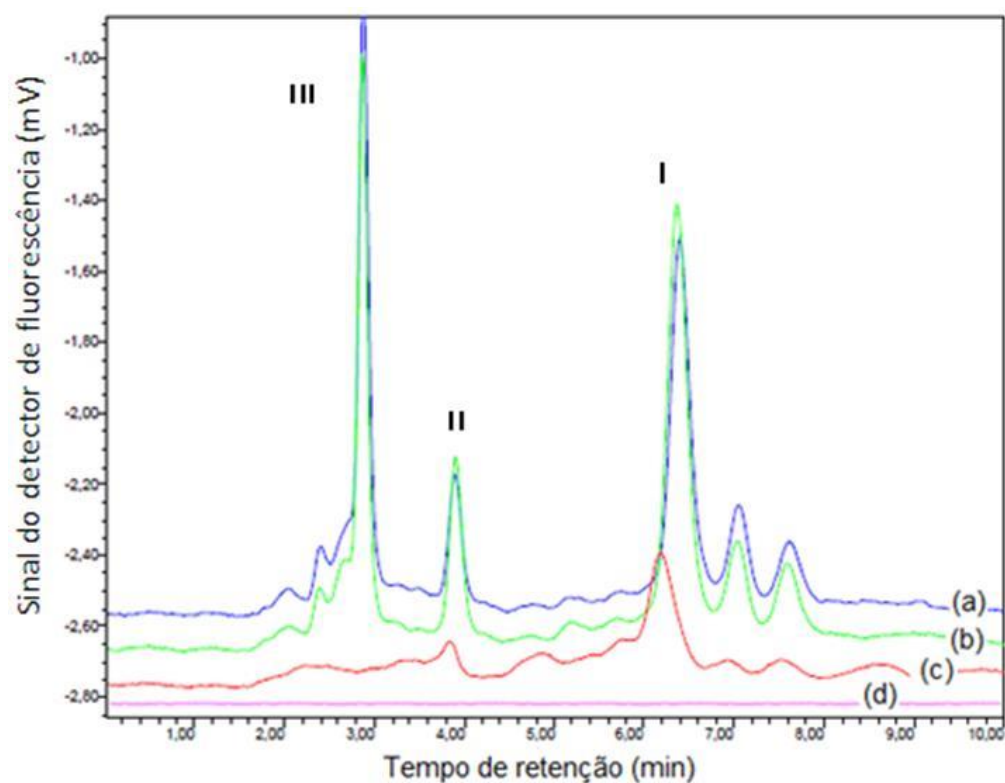


Figura 17: (a) Amostra exposta a radiação de 6 lâmpadas UV, (b) amostra exposta a radiação de 4 lâmpadas UV, (c) amostra exposta a radiação de 2 lâmpadas UV, (d) ensaio em branco por um tem de 25 min.



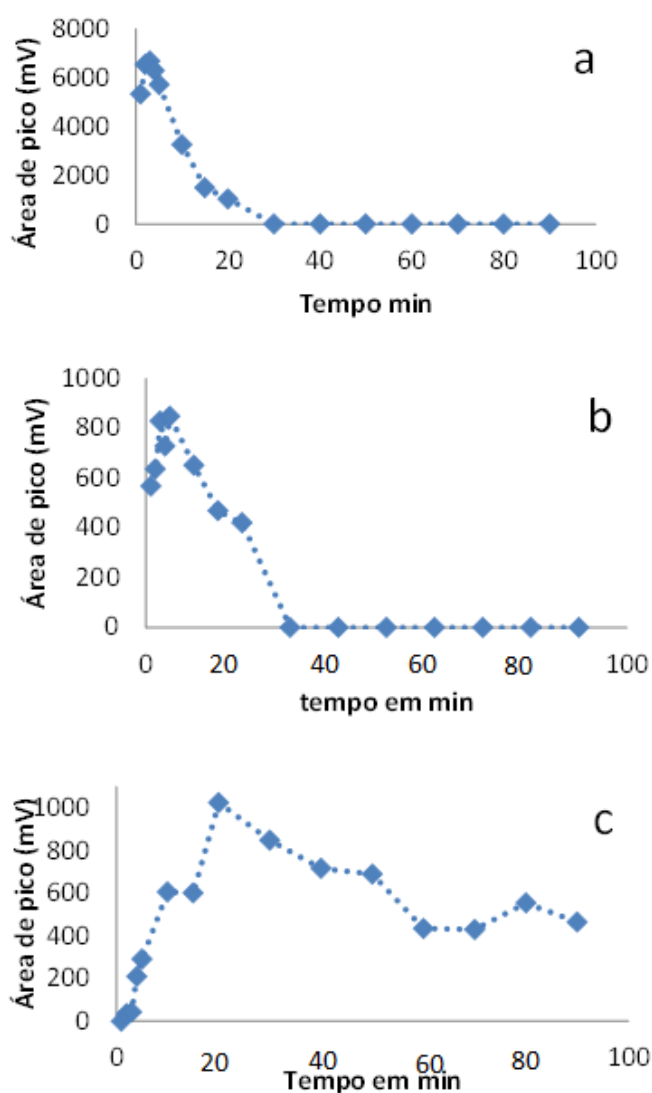


Figura 18: Fluorescência medida no HPLC-FL em área de pico para os derivados do ciclofenil em função do tempo de exposição ao UV: (a) fotoderivado I, (b) fotoderivado II e (c) fotoderivado III. Condições analíticas experimentais utilizadas: solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em metanol/tampão borato (pH 10,  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) 60/40% v/v, Loop de  $20 \mu\text{L}$ .

O comportamento dos sinais de fluorescência dos derivados em função do tempo de exposição ao UV indicou que o mecanismo proposto por Pacheco *et al.* (2008) está incompleto e contempla apenas a formação do fotoderivado II e fotoderivado II, no entanto, o experimento mostrou que a sequência de formação dos fotoderivados segue a lógica indicada no trabalho em questão. Vale ainda lembrar que as condições usadas no presente estudo são distintas das utilizadas por Pacheco *et al.* (2008), o que pode explicar quaisquer diferenças nos resultados..

Na Figura 19 são mostrados os cromatogramas das soluções de ciclofenil injetadas no cromatógrafo após exposição ao UV em tempos que variaram entre 0 e 40 min. Os picos dos fotoderivados do ciclofenil estão resolvidos (resolução de linha base) e seus tempos de retenção são de 2,5 min para o fotoderivado III; 3,8 min para o fotoderivado II e 6,8 min para o fotoderivado I.

Com 30 min de exposição ao UV, como já relatado anteriormente, verifica-se total eliminação dos picos do fotoderivado I e do fotoderivado II com o pico do fotoderivado III aparecendo no seu tempo de retenção característico (Figura 19 cromatograma b).

A fim de se avaliar a eficiência da separação cromatográfica, considerando que fez uso de uma coluna de 15 cm na determinação dos fotoderivados do ciclofenil e de acordo com os dados obtidos nos cromatogramas, calcularam-se os parâmetros cromatográficos e os resultados em relação ao fotoderivado III se mostraram bastantes satisfatórios com simetria de 0,9 e resolução igual a 2,2 (fotoderivado II – fotoderivado III) com número de pratos teóricos de  $4,7 \times 10^2$  e altura de prato de  $3,1 \times 10^{-2}$  cm.

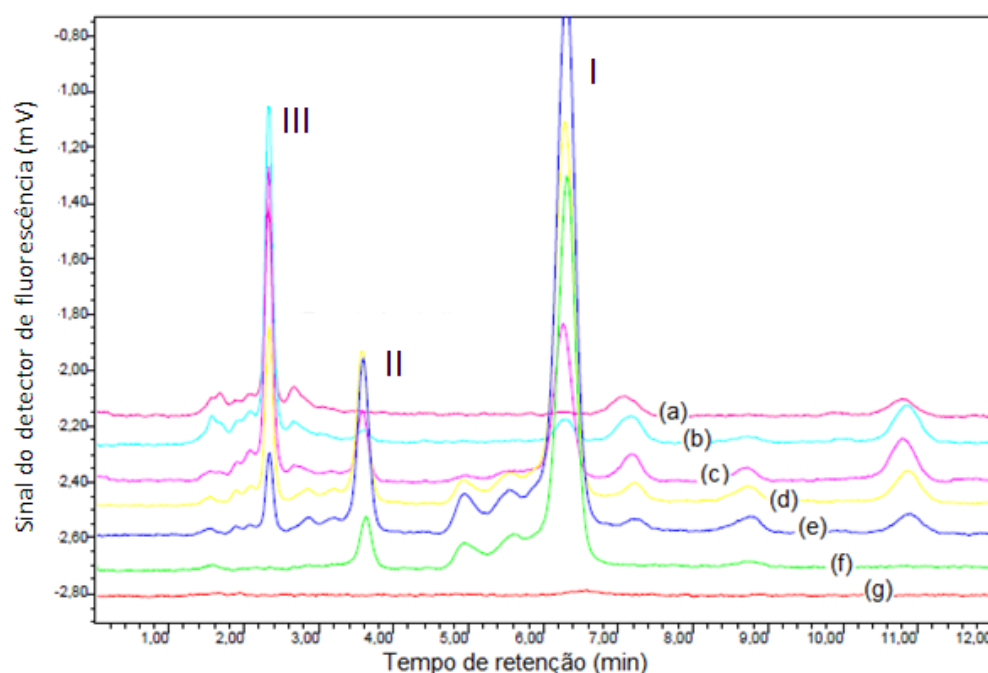


Figura 19: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  irradiada com UV por: (a) tempo de 40 min, (b) tempo de 30 min, (c) tempo de 20 min, (d) tempo de 15 min, (e) tempo de 10 min, (f) tempo de 5 min, (g) tempo de 0 min.

#### 4.1.4.

#### Otimização dos parâmetros instrumentais do cromatógrafo

Para a avaliação da influência da temperatura da coluna, as corridas cromatográficas foram realizadas com a temperatura do forno ajustada na faixa entre 25°C e 40°C. A temperatura na coluna tem um efeito direto nos tempos de retenção dos cromatogramas, pois a viscosidade do solvente diminui e a partição do analito entre a fase estacionária e a fase móvel se altera. A temperatura também tende a afetar o alargamento das zonas cromatográficas. O resultado do experimento indicou que na medida em que se aumentou a temperatura do forno, diminui-se o tempo de retenção dos picos. Optou-se para continuidade dos experimentos a temperatura de 35°C, como indicado na Figura 20.

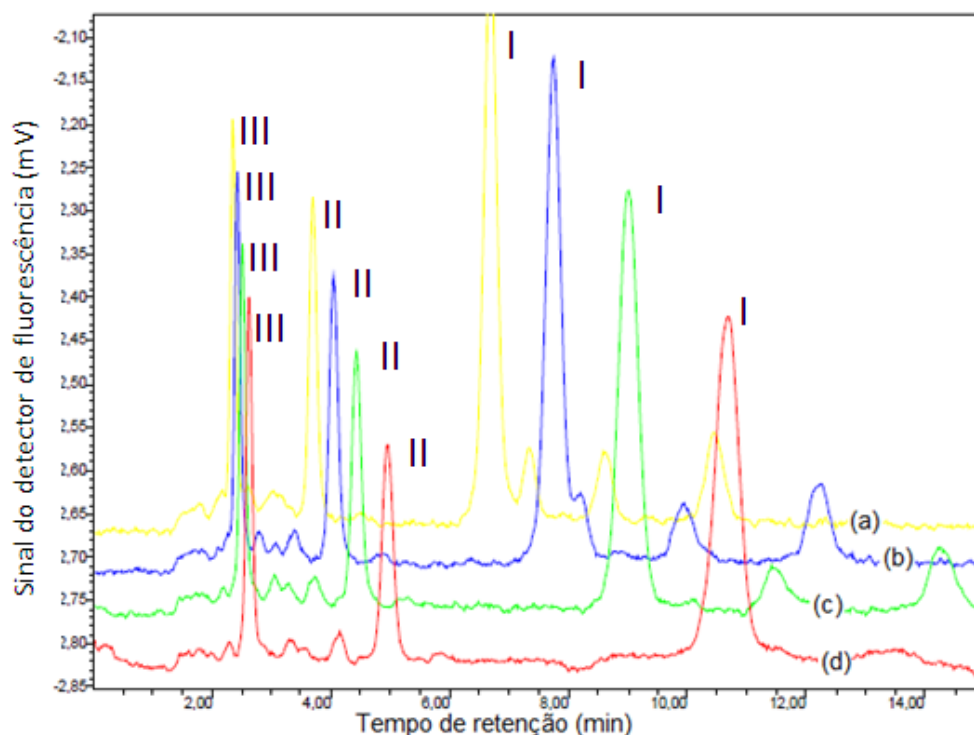


Figura 20: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  irradiada em metanol/tampão borato ( $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10) 60/40% v/v e fase móvel de mesma composição, variando a temperatura do forno em: (a) 40°C, (b) 35°C, (c) 30°C, (d) 25°C.

A eficiência da separação depende diretamente do tempo de contato entre a fase móvel e a fase estacionária, e esse contato depende do fluxo da fase móvel. Quanto menor o fluxo, maior será o contato da fase móvel com o preenchimento da coluna, o que permite que se estabeleça o equilíbrio dos analitos entre as duas fases. Por outro lado, fluxos pequenos de fase móvel

aumentam o tempo da corrida cromatográfica e provocam o alargamento das zonas. Assim, um estudo univariado com corridas cromatográficas isocráticas com diferentes fluxos de fase móvel (0,6; 0,8 e 1,0 mL min<sup>-1</sup>) foi realizado (Figura 21). Os resultados encontrados mostraram que na faixa estudada não houve diferença significativa nas áreas dos picos obtidos para o fotoderivado III, porém houve redução do tempo de retenção deste pico de 3,8 min (com 0,6 mL min<sup>-1</sup>) para 2,5 min (com 1,0 mL min<sup>-1</sup>). Optou-se para continuidade dos experimentos o fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

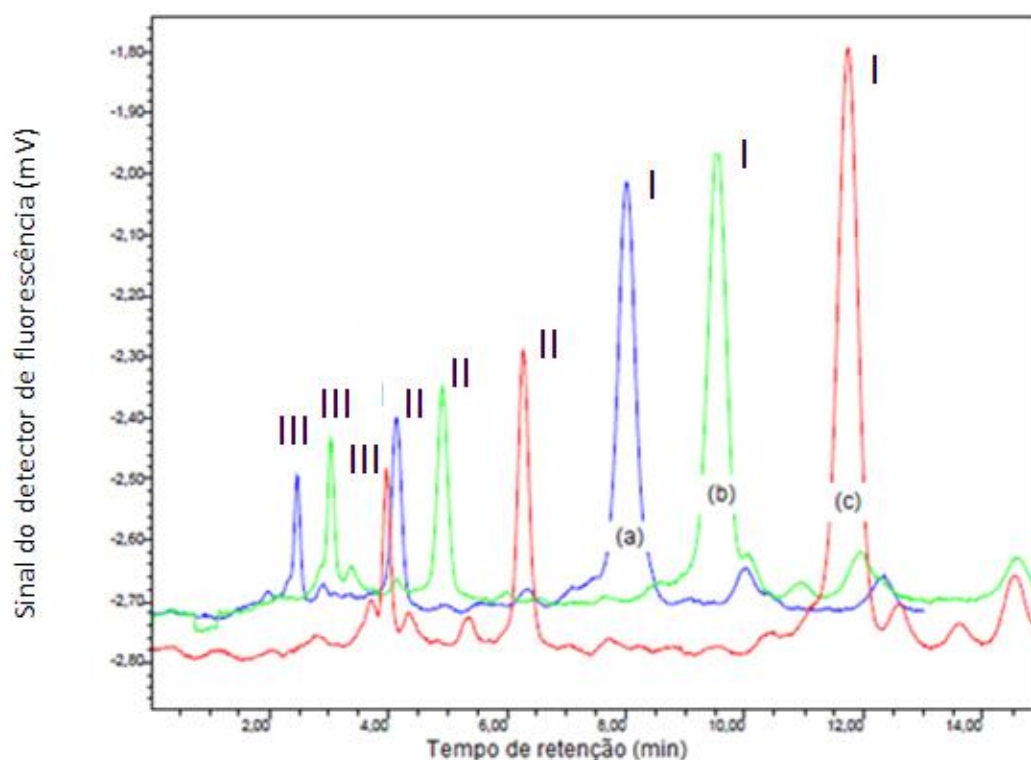


Figura 21: Cromatogramas de uma solução de ciclofenil  $5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> irradiada em metanol/tampão borato ( $10 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, pH 10) 60/40% v/v, na temperatura de 35°C e fase móvel de mesma composição, variando o fluxo em: (a) 1,0 mL min<sup>-1</sup>, (b) 0,8 mL min<sup>-1</sup>, (c) 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.1.5. Resumo das condições escolhidas

A otimização de parâmetros experimentais e instrumentais permitiu a escolha das condições ideais para a análise cromatográfica para a determinação do ciclofenil a partir do fotoderivado III). As condições escolhidas são indicadas na Tabela 5.

Nas melhores condições cromatográficas (Tabela 5) uma solução de concentração de  $5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> do padrão do ciclofenil após exposição ao UV

por 30 min foi injetada no HPLC, demonstrando a determinação seletiva do fotoderivados III do ciclofenil (Figura 22).

Tabela 5: Resumo das condições ótimas de trabalho para determinação de ciclofenil e de seus derivados por HPLC.

Parâmetros	Condições selecionadas
Concentração do tampão borato na fase móvel e na solução de amostra	$10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
pH do tampão	10
Temperatura do forno	35°C
Tempo de exposição ao UV	30 min
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$
Modo de eluição	Isocrático
Tempo total de corrida	4 min
Composição da fase móvel e da solução de amostra	Metanol/tampão 60/40% v/v
Fluxo fase móvel	$1,0 \text{ mL min}^{-1}$
Comprimento de onda (exc./em.)	328/374 nm

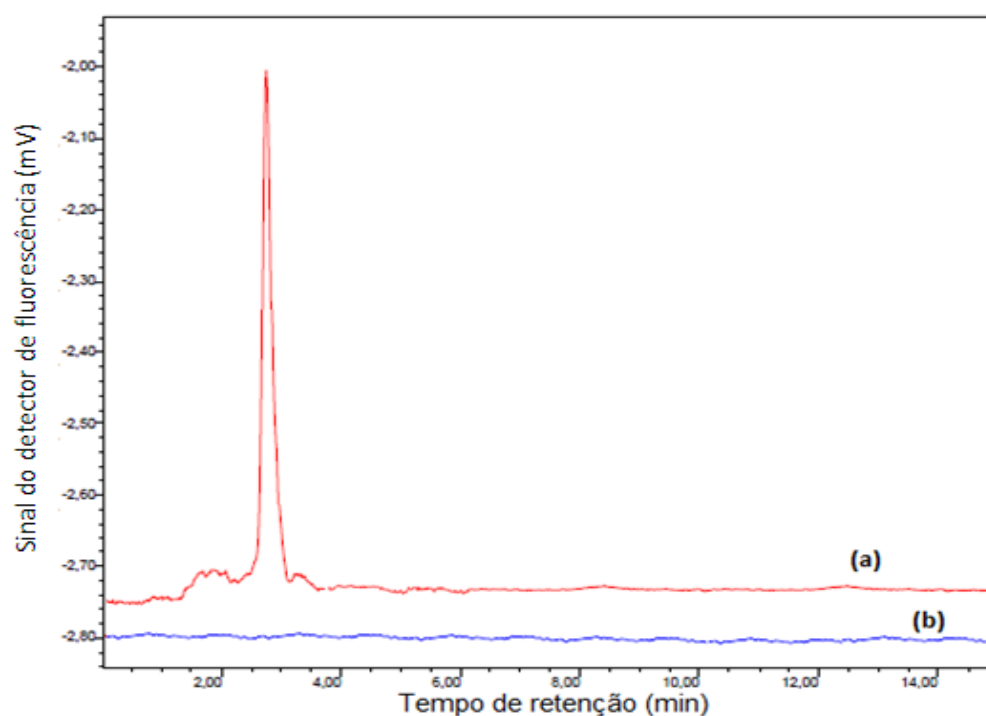


Figura 22: Cromatogramas mostrando o pico do fotoderivado III isolado, na injeção das soluções de medicamento do ciclofenil (a) e o branco (b), após 30 min de exposição ao tratamento UV.

## 4.2.

### Estudo de estabilidade

#### 4.2.1.

#### Estudo de estabilidade de padrão

A estabilidade da solução irradiada de ciclofenil foi avaliada, pois esta informação é importante para se conhecer o tempo máximo que a amostra pode ser acondicionada antes de ser analisada. Para tal, uma solução padrão  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil foi exposta ao UV por 30 min e seu cromatograma obtido logo após o tratamento. Em seguida essa solução foi acondicionada no escuro e na geladeira de modo que uma alíquota desta fosse injetada no cromatógrafo em períodos definidos ao longo de dez dias. Os resultados (Figura 23) indicaram que o sinal analítico do fotoderivado III é constante ao longo dos dois primeiros dias após o tratamento fotoquímico, o que indica a satisfatória estabilidade do fotoderivado depois que a exposição ao UV é cessada. Esse resultado garante a boa qualidade do resultado analítico se as análises forem realizadas no mesmo dia em que a derivação fotoquímica é feita.

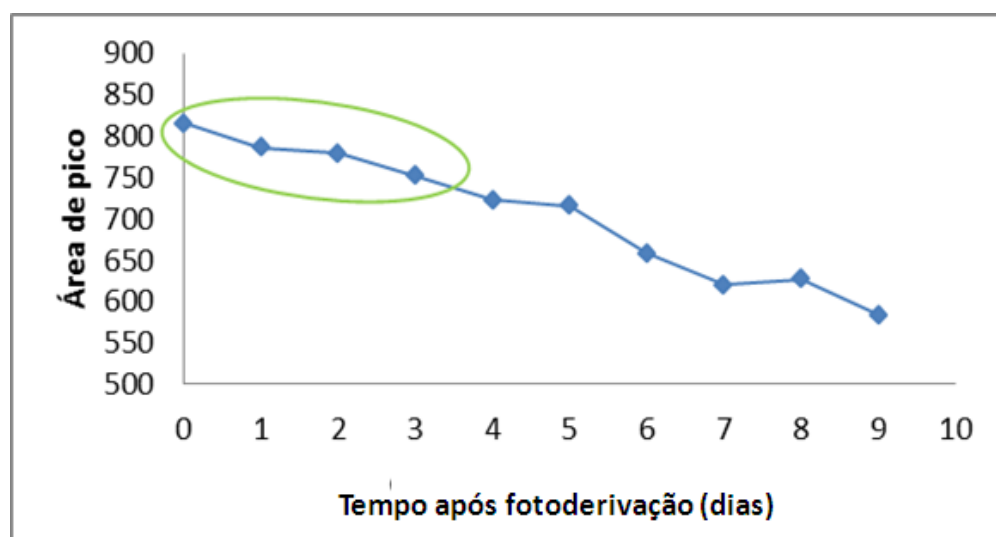


Figura 23: Estudo da estabilidade do sinal analítico (fluorescência em 328/374 nm) do fotoderivado III obtido após 30 min de exposição ao UV de uma solução padrão de ciclofenil ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções foram armazenadas na geladeira e no escuro.

Outro teste de estabilidade em intervalo de tempo mais curto foi realizado com o padrão com  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil irradiado (30 min de UV). Nesse caso, o sinal da solução foi medida ao longo de 30 h. Em função do curto período de tempo, as soluções não foram colocadas na geladeira, porém estas

foram mantidas ao abrigo da luz. Os resultados indicaram que a fluorescência do fotoderivado III praticamente não mudou ao longo do período (Figura 24), indicando uma boa estabilidade do sistema.

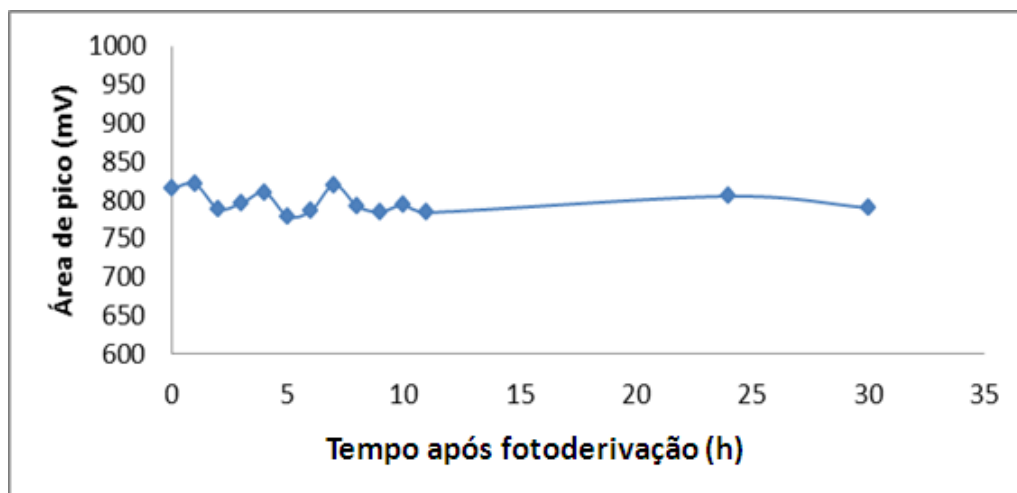


Figura 24: Estudo da estabilidade do sinal analítico (fluorescência em 328/374 nm) do fotoderivado III obtido após 30 min de exposição ao UV de uma solução padrão de ciclofenil ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções foram armazenadas na temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

#### 4.3.

##### Estudo de homogeneidade dos comprimidos de ciclofenil

Um estudo foi realizado visando à avaliação da homogeneidade da quantidade de ciclofenil presente nos comprimidos do medicamento escolhido para a realização das análises com o método desenvolvido. Para fazer os estudos de homogeneidade foram utilizados três lotes diferentes do medicamento Menopax adquiridos em drogarias de diferentes bairros do Rio de Janeiro.

Inicialmente, o estudo foi realizado com 10 comprimidos de cada lote. As soluções de amostras (cada comprimido foi uma amostra) foram preparadas de modo a se ter ciclofenil na concentração esperada de  $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados da Figura 25 mostram que a quantidade de ciclofenil nos comprimidos de cada um dos lotes é semelhante, indicando a homogeneidade do produto. No entanto, ao se comparar os três lotes diferentes, observou-se que um deles possuiu a metade da quantidade de ciclofenil dos outros dois lotes.

O resultado do teste mostrou que a homogeneidade por lote é garantida e o procedimento de análise de *pool* adotado no trabalho é adequado.

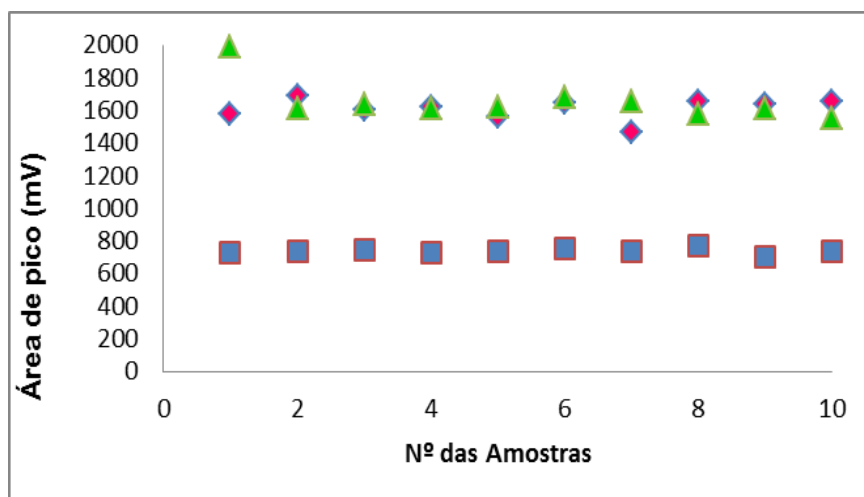


Figura 25: Estudo da homogeneidade da quantidade de ciclofenil em três lotes do medicamento Menopax. Amostras expostas ao UV por 30 min e fluorescência medida em 328/374 nm (área integrada do pico em  $t_R = 2,5$  min) no HPLC.

O teste de homogeneidade foi repetido com três novos lotes do medicamento Menopax denominados A, B e C. Desta vez, oito comprimidos de cada lote foram macerados e uma alíquota do pó resultante foi usada para a solubilização do ciclofenil de modo a se obter uma solução (concentração estimada em  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) para cada comprimido (24 soluções, oito por lote). A outra alíquota do pó (por exemplo, do lote A) foi misturada com alíquotas de um comprimido do lote B e de um comprimido do lote C de modo a se ter um pool de três comprimidos. Alíquotas desses *pools* de três comprimidos (total de oito *pools* de comprimidos) foram tratadas para a solubilização de ciclofenil. Após tratamento com UV (30 min) a fluorescência de cada comprimido e de cada *pool* de três comprimidos foram medidas. Os resultados se encontram na Tabela 6.



Tabela 6: Teste de homogeneidade com comprimidos de Menopax de três lotes distintos.

Nº Amostras	Sinal de fluorescência (área de pico em u.a.)			
	A	B	C	pool (A+B+C)
1	477	670	546	588
2	763	588	687	592
3	603	687	584	691
4	667	488	678	579
5	613	646	530	565
6	535	598	692	498
7	510	605	538	589
8	510	646	589	602

Um tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA) dos resultados foi realizado para avaliar o conjunto de dados. Os resultados da análise e os parâmetros estatísticos escolhidos estão resumidos, respectivamente, na Tabela 7 e na Tabela 8. O valor do parâmetro  $F_{\text{calculado}}$  (0,335) foi menor que o valor de  $F_{\text{crítico}}$  (2,947), indicando que não existe diferença significativa entre os três grupos de amostras e, conseqüentemente, há uma boa homogeneidade nos três lotes adquiridos.

Tabela 7: Parâmetros estatísticos no estudo de homogeneidade.

Grupo	Número total de réplicas	Soma	Média	Variância
Amostra A	8	4678	584,75	9275,64
Amostra B	8	4928	616,00	3910,00
Amostra C	8	4844	605,50	4844,57
Amostra A+B+C	8	4704	588,00	2790,29

Tabela 8: Resultados da ANOVA para o estudo de homogeneidade com 95% de limite de confiança.

Fonte da variação	SQ	Grau de liberdade	MQ	$F_{\text{calculado}}$	Valor-P	$F_{\text{crítico}}$
Entre grupos	5236,375	3	1745,458	0,335	0,710	2,947
Dentro dos grupos	145743,5	28	5205,125			
Total	150979,87	31				

#### 4.4.

#### Validação do método

A validação do método cromatográfico desenvolvido foi feita por meio da obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho, entre eles: seletividade, limites de detecção e de quantificação, faixa de resposta linear, robustez, precisão e exatidão.

##### 4.4.1.

##### Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, foram feitos testes, em triplicata (condições da Tabela 5), com soluções do padrão do analito e do medicamento do ciclofenil na concentração de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como mostra a Figura 26. As soluções foram expostas ao UV por 30 min e injetadas no cromatógrafo de modo a se obter tempos de retenção e áreas características. Observa-se pelos cromatogramas que os picos obtidos da solução padrão do analito e do medicamento de ciclofenil estão bem resolvidos, com áreas e tempos de retenção praticamente sobrepostos. Pelo ensaio em branco (b) pode-se evidenciar a ausência de interferências dos reagentes utilizados na preparação das soluções e dos excipientes presentes nas formulações farmacêuticas.

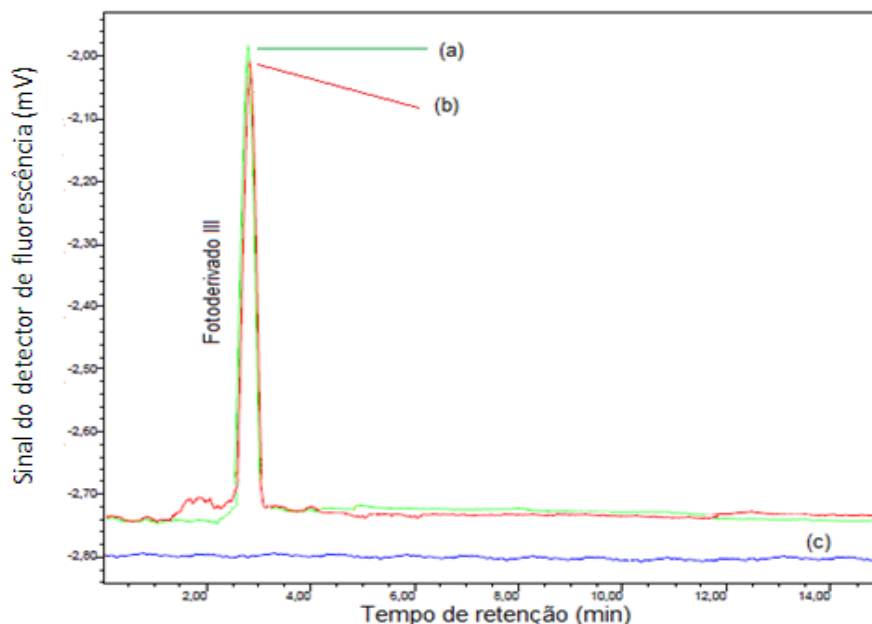


Figura 26: Cromatogramas mostrando o pico do fotoderivado III isolado do ciclofenil: (a) padrão do analito (b) medicamento (c) ensaio em branco, após exposição ao UV por 30 min.

#### 4.4.2.

#### Limite de detecção e de quantificação do equipamento

A determinação do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) foi feita para o para o fotoderivado III, o escolhido para a quantificação indireta de ciclofenil. Nas condições experimentais e instrumentais escolhidas para o método, sete injeções de concentração de analito ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram feitas, de modo a gerar o menor pico característico, visualmente detectável cuja área do pico pode apenas ser integrado manualmente. Os valores de LOD e LOQ foram então calculados conforme Equação (25) e Equação (26) e os resultados encontrados foram  $6,7 \times 10^{-8}$  e  $7,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

O resultado foi considerado bastante satisfatório já que o valor de LOD é compatível com os dos métodos propostos para determinação de ciclofenil usando voltametria e espectrofotometria (Pacheco *et al.* 2005 e 2008) que foram respectivamente  $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (LOD na cela eletroquímica) e de  $1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (usando a banda que pode conter a mistura do ciclofenil e de seus fotoderivados).

#### 4.4.3.

#### Resposta linear

Para se avaliar o modelo de resposta de sinal analítico em função da concentração de analito, foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de ciclofenil entre  $7,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . A curva obtida pode ser visualizada na Figura 27, onde se identifica uma faixa de resposta linear até a concentração de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil.

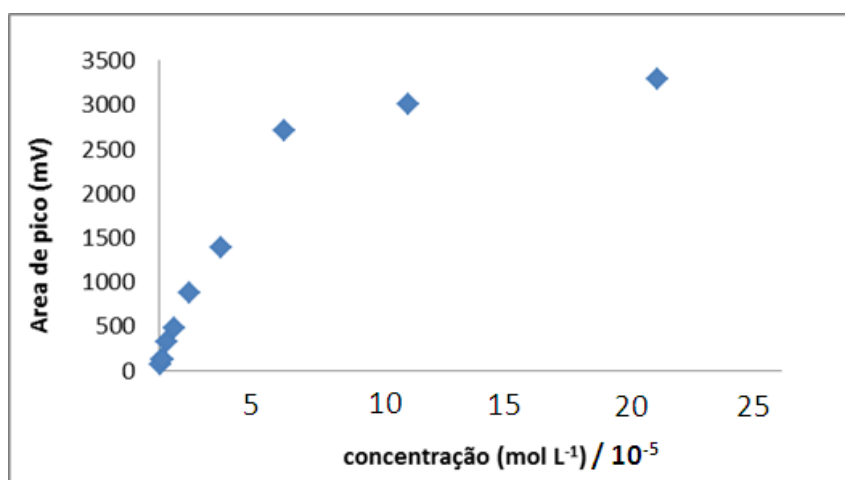


Figura 27: Curva analítica do fotoderivado III do ciclofenil.

Seguindo as diretrizes do DOQ-CGCRE-008, 2011 do INMETRO, a linearidade da resposta analítica do método desenvolvido foi avaliada pelos valores dos coeficientes de correlação linear e pela homogeneidade das variâncias (teste *t* de Student, teste F de Fischer, e gráfico de resíduos).

Na Figura 28 são mostradas duas curvas analíticas realizadas na faixa que iniciou no LOQ até  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de ciclofenil. Na Tabela 9 encontram-se os parâmetros de três curvas consecutivas realizadas. Os resultados mostram uma excelente reprodução das medições analíticas.

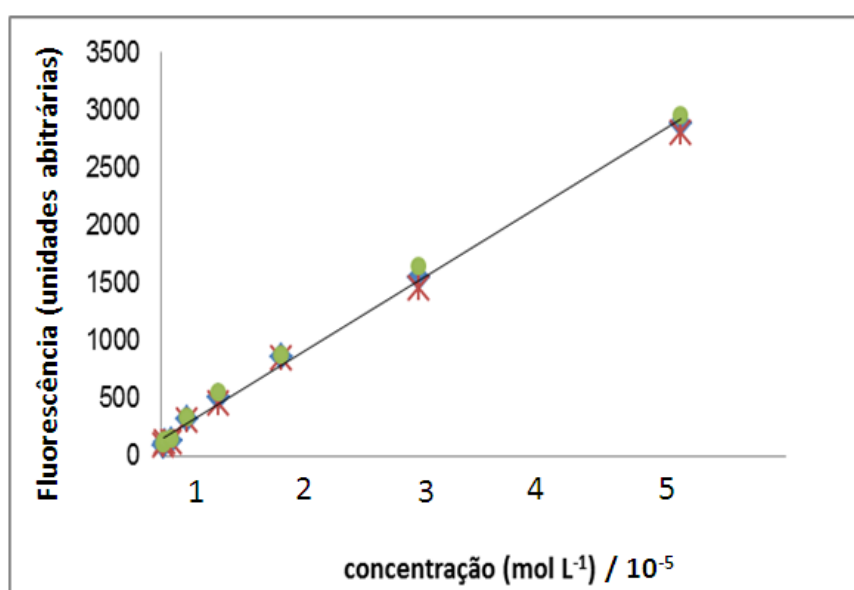


Figura 28: Curva analítica do fotoderivado III do ciclofenil após tratamento UV (injeções  $\pm$  desvio padrão).

Tabela 9: Parâmetros analíticos para avaliação da linearidade.

Parâmetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	$5,81 \times 10^7$	$5,69 \times 10^7$	$5,51 \times 10^7$
Interseção	$-1,91 \times 10^{-6}$	$-1,94 \times 10^{-6}$	$-2,13 \times 10^{-6}$
$R^2$	0,996	0,995	0,996
$R^2_{\text{adj}}$	0,995	0,994	0,995

Ao se avaliar os resultados da Tabela 9, observa-se que o comportamento linear foi obtido como indicado pelos coeficientes ( $R^2$  e  $R^2_{\text{adj}}$ )

superiores a 99 %. A adequação do modelo também foi avaliada pelos testes F e *t* de Student que indicaram a linearidade da faixa estudada.

O bom ajuste ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória no gráfico dos resíduos em torno da média (Figura 29). O ajuste ao modelo linear e a significância da regressão foi verificado por meio da ANOVA. A análise demonstrou regressões significativas ( $p < 0,001$ ) e o ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ), confirmando o comportamento homocedástico.

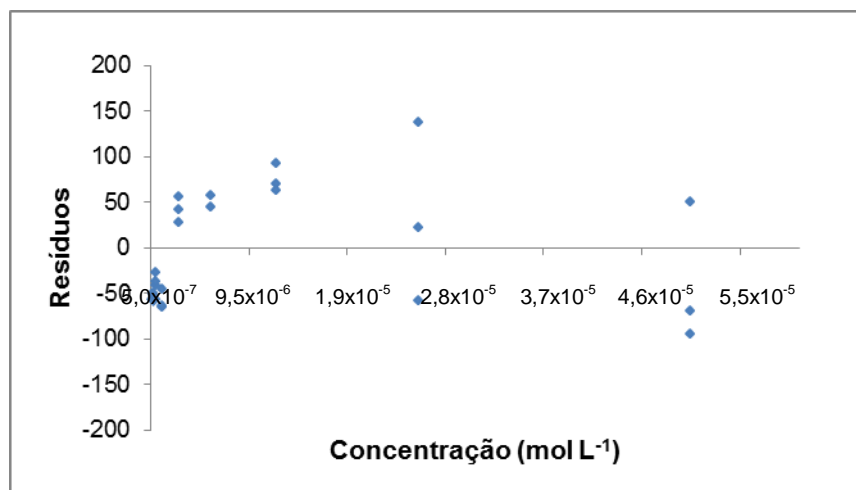


Figura 29: Gráfico de resíduos de todas as injeções na faixa linear da curva analítica para determinação do fotoderivado III do ciclofenil após 30 min de tratamento UV.

#### 4.4.4. Robustez

Para avaliar a robustez, em termos de sinal, alterações na proporção dos solventes na fase móvel, na temperatura do forno e no pH do tampão foram avaliadas nas faixas indicadas na Tabela 10. De acordo com os resultados obtidos nenhuma variação significativa de sinal foi observada nas condições estabelecidas no experimento o que indicou robustez do método em relação a esses parâmetros.

Tabela 10: Avaliação da robustez dos parâmetros experimentais e instrumentais

Parâmetros	Faixa robusta
pH do tampão ( $10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> )	9 – 10
Proporção de metanol na fase móvel (%)	60 – 68
Temperatura do forno (°C)	25 – 40

#### **4.4.5. Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação das análises de formulações farmacêuticas (Menopax). O procedimento para cada uma das amostras (quatro réplicas) foi feito conforme estabelecido para o método. Para o cálculo da recuperação se utilizou a Equação (27) e a Equação (28) (INMETRO, 2011). Os resultados encontrados em quatro concentrações distintas de ciclofenil ( $3,0 \times 10^{-6}$ ;  $6,0 \times 10^{-6}$ ;  $1,2 \times 10^{-5}$  e  $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram satisfatórios, pois as recuperações ficaram na faixa entre 95 e 104%.

#### **4.4.6. Precisão**

A avaliação da precisão foi determinada por meio de estudos da repetibilidade e da precisão intermediária.

##### **4.4.6.1. Estudo da repetibilidade**

A repetibilidade dos resultados foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR), como descrito na Equação (29). A repetibilidade foi avaliada em três níveis de concentração ao longo da faixa linear de trabalho (em um ponto acima do LOQ, no ponto médio da curva, e em um ponto na parte superior da curva). Para cada nível de concentração foram realizadas cinco réplicas autênticas. Como as medições de ciclofenil foram feitas de forma indireta após tratamento UV, os experimentos fugiram um pouco as diretrizes para repetibilidade, já que neste caso, a posição dos tubos do reator pode influenciar o resultado. Assim, os resultados aqui apresentados para repetibilidade foram feitos da seguinte maneira: injeções realizadas de uma mesma concentração, em um mesmo dia, em condições experimentais e instrumentais idênticas, exceto a mesma posição dentro do reator UV.

Os resultados encontrados mostraram uma boa repetibilidade como indica os valores de DPR entre 2,0 e 4,0%. Segundo o documento regulatório da ANVISA, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, não se admitem valores superiores a 5% para o DPR. Por sua vez, os valores de HorRat obtidos em todos os níveis de concentração avaliados foram menores do que 1, o que comparando com os valores da Tabela 11, indica que a metodologia pode ser considerada repetitiva (Horwitz & Albert, 2006).

Tabela 11: avaliação da repetibilidade para cada nível de concentração do ciclofenil segundo HorRat

Concentração mol L <sup>-1</sup>	Valor calculado (HorRat)
$3,0 \times 10^{-6}$	0,51
$6,0 \times 10^{-6}$	0,47
$1,2 \times 10^{-5}$	0,47
$2,5 \times 10^{-5}$	0,77

**4.4.7.****Estudo da precisão intermediária**

A precisão intermediária foi calculada a partir de experimentos realizados em quatro dias distintos e consecutivos. Analisou-se a mesma solução padrão em quatro níveis de concentração, sendo que para cada nível foram realizadas cinco réplicas.

A partir dos valores de  $F_{\text{calculado}}$ , pode-se afirmar que não há diferença significativa entre as variâncias das análises realizadas em dois dias diferentes ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ) para todos os níveis. Comparou-se também a média dos resultados obtidos (dia 1 em relação aos demais dias) a partir do estudo da precisão intermediária com o teste t. Os resultados indicaram não haver diferença significativa entre as médias das análises realizadas nos quatro dias consecutivos ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ), exceto para o ponto referente à concentração  $1,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, provavelmente, devido a problemas aleatórios operacionais.

A seguir, as Tabelas (Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15) mostram um resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) realizados nos quatro níveis de concentração ( $3,0 \times 10^{-6}$ ;  $6,0 \times 10^{-6}$ ;  $1,2 \times 10^{-5}$  e  $2,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>).

Tabela 12: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto  $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>

Resumo						
Grupo	Réplicas	Soma	Média	Variância		
Coluna 1	3	$9,0 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-15}$		
Coluna 2	3	$9,1 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$6,7 \times 10^{-15}$		
Coluna 3	3	$9,1 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-14}$		
Coluna 4	3	$9,3 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-14}$		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-p	F crítico
Entre grupos	$2,1 \times 10^{-14}$	3	$7,1 \times 10^{-15}$	0,87	0,50	4,07
Entre dos grupos	$6,5 \times 10^{-14}$	8	$8,2 \times 10^{-15}$			
Total	$8,7 \times 10^{-14}$	11				

Tabela 13: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto  $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 

Resumo							
Grupo	Réplicas	Soma	Média	Variância			
Coluna 1	3	$1,8 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-14}$			
Coluna 2	3	$1,8 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-14}$			
Coluna 3	3	$1,8 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-6}$	$6,7 \times 10^{-15}$			
Coluna 4	3	$1,8 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-15}$			
ANOVA							
Fonte da variação		SQ	gl	MQ	F	Valor-p	F crítico
Entre grupos		$2,1 \times 10^{-14}$	3	$7,1 \times 10^{-15}$	0,64	0,61	4,07
Entre dos grupos		$8,8 \times 10^{-14}$	8	$1,1 \times 10^{-14}$			
Total		$1,1 \times 10^{-13}$	11				

Tabela 14: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto  $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (ANOVA: fator unico).

Resumo						
Grupo	Réplicas	Soma	Média	Variância		
Coluna 1	3	3,58 x 10 <sup>-5</sup>	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x10 <sup>-14</sup>		
Coluna 2	3	3,77 x 10 <sup>-5</sup>	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-15</sup>		
Coluna 3	3	3,75 x 10 <sup>-5</sup>	1,2 x 10 <sup>-5</sup>	5,5 x 10 <sup>-15</sup>		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-p	F crítico
Entre grupos	1,9 x 10 <sup>-13</sup>	2	9,6 x 10 <sup>-14</sup>	10,15	0,01	5,14
Entre dos grupos	5,7 x 10 <sup>-12</sup>	6	9,4 x 10 <sup>-15</sup>			
Total	2,5 x 10 <sup>-13</sup>	8				

Tabela 15: Resumo dos experimentos e o tratamento estatístico (ANOVA) para o ponto  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (ANOVA: fator unico).

Resumo							
Grupo	Réplicas	Soma	Média	Variância			
Coluna 1	3	7,5 x 10 <sup>-5</sup>	2,50 x 10 <sup>-5</sup>	5,4 x10 <sup>-14</sup>			
Coluna 2	3	7,4 x 10 <sup>-5</sup>	2,47 x 10 <sup>-5</sup>	6,9 x 10 <sup>-13</sup>			
Coluna 3	3	7,5 x 10 <sup>-5</sup>	2,48 x 10 <sup>-5</sup>	4,0 x 10 <sup>-13</sup>			
ANOVA							
Fonte da variação		SQ	gl	MQ	F	Valor-p	F crítico
Entre grupos		1,6 x 10 <sup>-13</sup>	2	8,2 x 10 <sup>-14</sup>	0,21	0,81	5,14
Entre dos grupos		2,3 x 10 <sup>-12</sup>	6	3,8 x 10 <sup>-13</sup>			
Total		2,5 x 10 <sup>-12</sup>	8				



#### 4.5. Incerteza de medição

A incerteza associada ao método desenvolvido foi estimada com as fontes de incerteza mais relevantes agrupadas em quatro grupos principais: (i) Preparo de soluções críticas, (ii) Repetibilidade, (iii) Precisão intermediária (variação dia), (iv) Curva analítica. Uma vez estimada a incerteza de cada componente, calculou-se as incertezas combinada e expandida. A Figura 30 mostra o diagrama de causa e efeito considerado na indicação das fontes das incertezas mais relevantes para o processo de medição para quantificação indireta do ciclofenil por HPLC após tratamento fotoquímico.

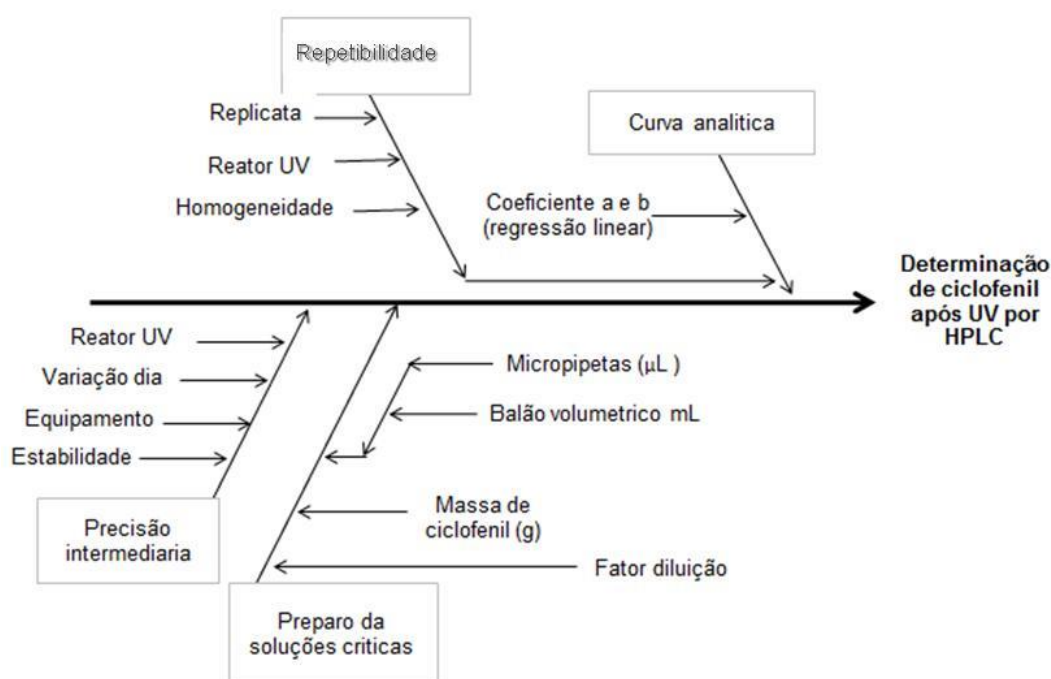


Figura 30: Diagrama de causa e efeito mostrando as fontes mais relevantes.

Para o cálculo da incerteza associada ao preparo de soluções críticas ( $u_s$ ), os parâmetros (incertezas) considerados foram: massa do analito, volume do balão volumétrico e da micropipeta e o fator de diluição. O cálculo foi realizado conforme Equação (41):

$$u = \sqrt{\left(\left(\frac{U_{mpl}}{k}\right)^2 + \left(\frac{U_{bv}}{k}\right)^2\right) (U_{fd}) \left(\frac{U_{bal}}{k}\right)^2} \quad (41)$$

Onde:

$U_{mpi}$ : a incerteza da micropipeta de 10 - 1000 L,

$U_{bv}$ : a incerteza do balão volumétrico,

$U_{fb}$ : a incerteza do fator de diluição,

$U_{fb}$ : a incerteza da balança e k o fator de abrangência de cada componente.

A incerteza combinada de cada componente é dada pela razão entre o valor da incerteza expandida “U” expressa no certificado de calibração e o fator de abrangência “k”. Os certificados referentes às calibrações do balão volumétrico, balança e micropipetas se encontram nos anexos I, II e III.

A incerteza associada à repetibilidade ( $u_r$ ) foi estimada a partir do desvio padrão “ $s_r$ ” resultante da análise em triplicata dos quatro níveis de concentração de soluções padrão de ciclofenil após tratamento UV. A incerteza associada à precisão intermediária ( $u_{pi}$ ) foi obtida do mesmo modo que a incerteza relacionada à repetibilidade, porém o cálculo foi realizado a partir da estimativa do desvio padrão da precisão intermediária “ $s_{pi}$ ”, a partir da Equação (30).

Já para a realização do cálculo da incerteza associada à curva analítica utilizou-se a Equação (42):

$$u_{curva} = \sqrt{(c_{ia}^2 \times S^2 a) + (c_{ib}^2 \times S^2 b) + (2c_{ia} \times c_{ib} \times u_a \times u_b \times r)} \quad (42)$$

Onde:

$c_{ia}$  e  $c_{ib}$ : são coeficientes de sensibilidade,

$S_a$  e  $S_b$ : são os desvios padrões dos coeficientes angular e linear respectivamente e  $r$  é o coeficiente de correlação.

Os coeficientes de sensibilidade são usados para uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à unidade do mensurando e podem ser obtidos a partir da Equação (43) e da Equação (44).

$$c_{ia} = \frac{y_{maior(u.a)} - b}{a^2} \quad (43)$$

$$c_{ib} = -\frac{1}{a} \quad (44)$$

Onde:

“b” é a intercepção da reta e

“a” é a inclinação da reta.

Os desvios padrão e o coeficiente de correlação podem ser obtidos a partir da Equação (45), da Equação (46) e da Equação (47).

$$S_a^2 = \frac{S^2 \sum C^2}{a^2} \quad (45)$$

$$S_b^2 = \frac{n \times S^2}{D} \quad (46)$$

$$r = -\frac{\sum C}{\sqrt{n(\sum C^2)}} \quad (47)$$

Onde:

C: Concentração do analito utilizado para a construção da curva e

n: número de pontos.

Os valores de  $s^2$  e  $D$  correspondem à variância e ao desvio da curva respectivamente, sendo dados pela Equação (48) e pela Equação (49).

$$D = \left( n \times \sum C^2 \right) - \left( \sum C \right)^2 \quad (48)$$

$$S^2 = \frac{\sum \Delta^2}{\sqrt{n-2}} \quad (49)$$

Onde:

$\Delta$ : é a diferença entre o valor teórico de C ( $C_{teórico}$ ) no melhor ajuste da curva e o valor experimental de C ( $C_{experimental}$ ).

As incertezas  $u_a$  e  $u_b$  são obtidas a partir da Equação (50) e da Equação (51).

$$u_a = S_a \quad (50)$$

$$u_b = S_b \quad (51)$$

A incerteza combinada ( $u_c$ ), obtida pela raiz quadrada da soma quadrática de todas as contribuições de incerteza relativas à medição de ciclofenil após tratamento UV, bem como a incerteza expandida e demais incertezas associadas à medição é apresentada na Tabela 16. Na Figura 31 é apresentado o gráfico de contribuição referente a cada fonte de incerteza associada.

Tabela 16: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para determinação indireta do ciclofenil após tratamento UV.

Fontes de incertezas	[Ciclofenil] após UV (mol L <sup>-1</sup> )			
	P1 3,0 x 10 <sup>-6</sup>	P2 6,0 x 10 <sup>-6</sup>	P3 1,2 x 10 <sup>-5</sup>	P4 2,5 x 10 <sup>-5</sup>
Repetibilidade ( $u_r$ )	9,0 x 10 <sup>-8</sup>	1,0 x 10 <sup>-7</sup>	9,7 x 10 <sup>-8</sup>	6,2 x 10 <sup>-7</sup>
Precisão intermediária ( $u_{pi}$ )	1,5 x 10 <sup>-7</sup>	1,5 x 10 <sup>-7</sup>	4,4 x 10 <sup>-7</sup>	4,0 x 10 <sup>-7</sup>
Preparo de soluções $u_s$ (volume)	7,3 x 10 <sup>-7</sup>	7,3 x 10 <sup>-7</sup>	7,3 x 10 <sup>-7</sup>	7,3 x 10 <sup>-7</sup>
Curva analítica $u_{(curva)}$	6,7 x 10 <sup>-7</sup>	6,7 x 10 <sup>-7</sup>	6,7 x 10 <sup>-7</sup>	6,7 x 10 <sup>-7</sup>
Incerteza combinada ( $u_{combinada}$ )	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	1,1 x 10 <sup>-6</sup>	1,2 x 10 <sup>-6</sup>
Percentual %	34%	16%	8%	5%
Incerteza expandida ( $U_{k=2; 95\%}$ )	2,0 x 10 <sup>-6</sup>	2,0 x 10 <sup>-6</sup>	2,2 x 10 <sup>-6</sup>	2,5 x 10 <sup>-6</sup>

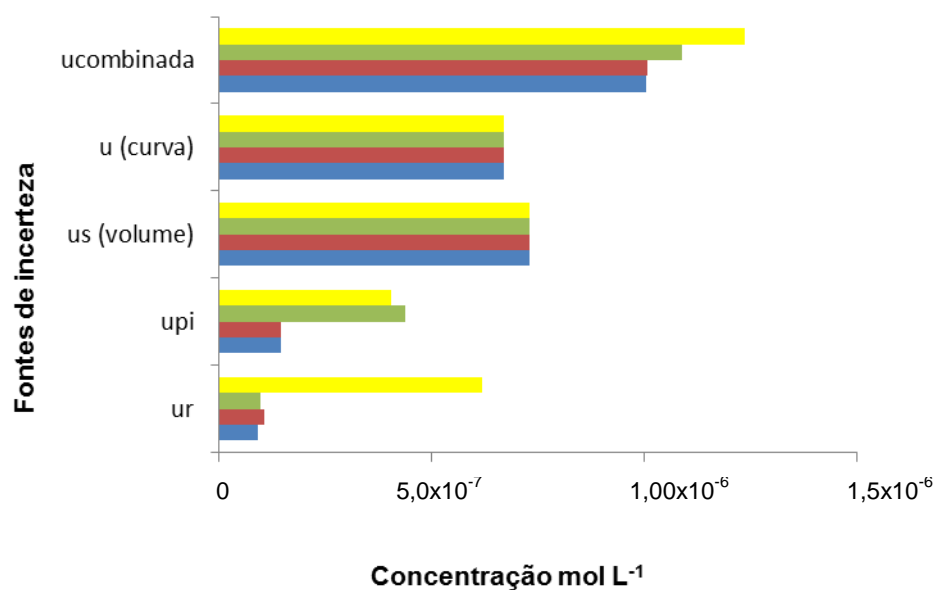


Figura 31: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada ( $u_c$ ) da medição de ciclofenil após tratamento UV para as seguintes concentrações: (P1)  $3,0 \times 10^{-6}$ ; (P2)  $6,0 \times 10^{-6}$ ; (P3)  $1,2 \times 10^{-5}$  e (P4)  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

A partir dos resultados apresentados observa-se que as fontes que mais contribuem para a incerteza estão associadas ao preparo das soluções e à construção da curva analítica. Uma alternativa para minimizar a incerteza no P1 seria fazer o desdobramento da curva analítica em duas e realizar o preparo das soluções por meio de ajuste de massa, o que levaria em conta apenas a incerteza da balança analítica, minimizando assim o valor de  $u_s$ .

Já para os pontos P2, P3 e P4, observa-se que na medida em que aumenta a concentração, as incertezas associadas à repetibilidade e à precisão intermediária tendem a aumentar, no entanto este aumento é proporcional ao aumento da concentração analisada, possuindo uma contribuição mínima na incerteza final, já que nestes pontos o valor desta já é baixo (ver % de contribuição na Tabela 16).

## 5 Conclusão

No presente trabalho foi desenvolvido um método para determinação indireta de ciclofenil, por meio de um de seus fotoderivados, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência (328/374 nm). O método desenvolvido traz como vantagens uma boa sensibilidade, alta estabilidade de sinal, um custo relativamente reduzido (baixo consumo de solvente) e baixa produção de rejeitos tóxicos.

A validação intralaboratorial e a estimativa da incerteza de medição, ferramentas essenciais para garantir a confiabilidade metrológica dos resultados, foram realizadas e os resultados obtidos mostraram um grande potencial no método proposto. Por meio de testes de recuperação, a aplicabilidade do método analítico desenvolvido foi avaliada em uma matriz farmacêutica (comprimido de ciclofenil) e os resultados mostraram-se satisfatórios.

A comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho, com aqueles apresentados na literatura (Pacheco *et al.*, 2008) indicou que os limites de detecção e de quantificação se encontram na mesma ordem de grandeza. Porém, o método cromatográfico permite a determinação apenas do fotoderivado III e não o sinal do conjunto das espécies químicas envolvidas no processo, o que aumenta a robustez do método. Além disso, os trabalhos publicados que abordam os métodos de espectrofotometria de absorção e de fluorescência (Pacheco *et al.*, 2008) não possibilitam a análise do ciclofenil em matrizes complexas como as amostras biológicas. Embora não testado, o método cromatográfico tem o potencial de permitir análises de fluidos biológicos.

Os estudos de homogeneidade foram baseados em três lotes distintos e demonstraram, após tratamento estatístico que o produto não apresentou diferença significativa para o nível de 95% de confiança. Já os estudos de estabilidade em curto prazo realizados demonstraram que, após a formação, o fotoderivado III pode ser considerado bastante estável (dois dias).

O método analítico desenvolvido pode contribuir para o controle de qualidade de medicamentos contendo ciclofenil, para o monitoramento fisiológico de pacientes em uso terapêutico da substância e para teste antidoping em competições desportivas.

O método proposto corroborou, em parte, os resultados encontrados por Pacheco, no entanto mais estudos serão necessários para confirmar esse mecanismo, pois os cromatogramas indicaram a possibilidade de existir mais um fotoderivado no processo. A existência desse terceiro fotoderivado não afeta a metodologia analítica, pois ele se degrada antes da formação do fotoderivado III (efetivamente usado na quantificação indireta do ciclofenil).

Como trabalhos futuros, propõe-se:

- Aplicação do método desenvolvido em amostras biológicas. Neste caso, será necessária a realização de novos estudos da fotoderivação e das fases móvel e estacionária para minimizar as possíveis interferências da matriz e, se necessário for, aumentar a sensibilidade;
- Confirmar o mecanismo proposto com estudos por espectrometria de massa.
- Completar os estudos de estabilidade em longo prazo e de caracterização do medicamento e estimar a incerteza do material;
- Desenvolver, em parceria com o INMETRO, um material de referência certificado para a determinação indireta do ciclofenil.

## Referências Bibliográficas

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO Guia 30, **Termos e definições relacionadas com materiais de referência**. Primeira Edição, 2008.

ABNT. Rio de Janeiro. 2012b. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025:2005** Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. AHMED, S., Rio de Janeiro. 2005.

ANVISA. **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, disponível em Agência Nacional de Vigilância Sanitária: <http://portal.Anvisa.gov.br/wps/portal/Anvisa/home>. Acesso em 28 de janeiro de 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Insumos Farmacêuticos**, disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Insumos+Farmaceuticos>. Acesso em 4 de agosto de 2012a.

BIPM. **Bureau Internacional de Pesos e Medidas**, disponível em: <http://www.bipm.org/fr/committees/>. Acesso em 8 de julho de 2012a.

BIPM. **Bureau Internacional des Poids et Mesures**, disponível em Bureau Internacional des pois et mesures: <http://www.bipm.org/en/home> Acesso em 8 de julho de 2012,

BIPM. **Bureau International des Poids et Mesures**, disponível em <http://www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/>. Acesso em 8 de julho de 2012b

BIPM. **Bureau International des Poids et Mesures**, disponível em: <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jcgm/>. Acesso em 2 dezembro de 2012c.

BRABANTER N, GANSBEKE W V, GELDOF L, EENOO P V. **An improved gas chromatography screening method for doping substances using triple quadrupole mass spectrometry, with an emphasis on quality assurance**. Biomed. Chromatogr. 26, 1416, 2012.

CRUCS J. R., et al. **Analysis of cyclofenil in bovine tissue**. Journal Association of Analysis Chemical. 55, 643, 1972.



CUNHA, A. L. M. C., **Desenvolvimento e Validação de Método Fosforimétrico em Substrato de Celulose para Determinação de Pireno e Criseno**. Tese de Doutorado – Departamento de Química, PUC - Rio, Rio de Janeiro, 2007.

EURACHEM. **A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 1998

EURACHEM. Disponível em: <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>. Acesso em 20 de novembro de 2012.

EURACHEM. **Terminology in Analytical Measurement: Introduction to VIM 3**, disponível em: <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/48-gdtam> 12. Acesso em 2 de maio de 2012.

EURACHEM. **Traceability in Chemical Measurement (2003)**. Disponível em: <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/trc>. Acesso em 20 de novembro de 2012.

GARTNER Peter, K. H., et al. **Synthesis and identification of hydroxylated metabolites of the anti-estrogenic agent cyclofenil**. Journal Mass Spectrom. 43, 958, 2008.

GOTO S, TAKAKURA K, NAKANISHI K, YOKOI T, NODA Y. **Efficacy of clomiphene citrate and cyclofenil for infertile women with normal ovulatory cycles**. Fertility and Sterility, 76(2), agosto de 2001.

HASSAN, E. M., EI SAYED M. A., KRAMIS E. F. **Second-derivative spectrophotometric determination of cyclofenil in the presence of its acid-induced degradation product**. STP Pharma Sciences, 4, 305, 1994.

HUANG K., BARRON A. R., **Physical methods in chemistry and nano science**. Rice University, CHEM 475, 2012.

ILAC. **Internacional laboratório acreditação**, disponível em: [https://www.ilac.org/iad\\_wada.html](https://www.ilac.org/iad_wada.html). Acesso em 8 de maio de 2012a.

ILAC. **Internacional laboratório acreditação**, disponível em: <https://www.ilac.org/publicationsandresources.html>. Acesso em 8 de maio de 2012b

ILAC. **Internacional laboratorio acreditação**, disponível em: [www.ilac.org](http://www.ilac.org), Acesso em 8 de maio de 2012.

IMEKO. **Confederação Internacional de Medição**, disponível em <http://www.imeko.org/> Acesso em 12 de maio de 2012.

INMETRO. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**, disponível: <http://www.inmetro.gov.br/>. Acesso em 2 de maio de 2012.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Metrologia Científica e Industrial**, disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inmetro/sinmetro.asp>. Acesso em 5 de julho de 2012b.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>. Acesso em 4 de julho de 2012c.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008 Revisão 4 de julho de 2011.

ISO. **International Organization for Standardization**, disponível em <http://www.iso.org/iso/home/about.htm>. Acesso em 26 de maio de 2012.

ISO. International Organization for Standardization. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. ISO/IEC 17025:2005

IUPAC. **União Internacional da Química Pura e Aplicada**, disponível em: <http://old.iupac.org/general/about.html>. Acesso em 20 de dezembro de 2012.

IUPAC. **União Internacional da Química Pura e Aplicada**, disponível em: <http://www.iupac.org/publications/pac/2004/pdf/7602x0443.pdf>. Acesso em 20 de janeiro de 2012a.

IUPAC. União Internacional da Química Pura e Aplicada. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of Analysis**, disponível em <http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>. Acesso em 12 de março de 2012c.

JCGM 200:2012 International Vocabulary of Metrology – **Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM)**, disponível em: <http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>. Acesso em 10 de maio de 2012.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. São Paulo, Brasil, 2009.

LEÃO, D. **Estatística para Metrologistas e Cálculo de Incerteza**. 2007.

LEBRE, D.T. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação de herbicidas e inseticidas em águas superficiais utilizando extração líquido-sólido e cromatografia líquida de alta eficiência**. São Paulo, Brasil, 2000. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

LINDSAY S. **High Performance Liquid Chromatography**, London, UK, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas: **Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa**, Brasília – DF, 2008.

MYUNG S. W., MIN H. K., KIM D. H., KIM M., CHA S., YOO E. A., YIM Y. H. **Mass spectrometric analysis cyclofenil and its metabolites in human urine.** Rapid Commun. Mass Spectrom. 16(8), 761, 2002.

OIML. **Organização Internacional de Metrologia Legal**, disponível em Organização Internacional de Metrologia Legal: <http://www.oiml.org/>. Acesso em 25 de abril de 2012

OIML. **Organização Internacional de Metrologia Legal**, disponível em Organização Internacional de Metrologia Legal: [http://www.oiml.org/tc\\_sc/index.html](http://www.oiml.org/tc_sc/index.html), Acesso em 4 de maio de 2012a

OIML. Organização Internacional de Metrologia Legal. TC 16/SC 3: **Pesticides and other pollutant toxic substances. R 112: High performance liquid chromatographs for measurement of pesticides and other toxic substances**, Disponível em: [http://www.oiml.org/tc\\_sc/index.html](http://www.oiml.org/tc_sc/index.html). Acesso em 20 de maio de 2012b.

PACHECO W. F., FARIAS P. A. M., AUCELIO R. Q. **Square-wave adsorptive stripping voltammetry for the determination of cyclofenil after photochemical derivatization.** Analytica. Chimica. Acta, 549, 67, 2005.

PACHECO W. F., BATALHA J. A., de OLIVEIRA C. C. AUCELIO R. Q. **Fluorimetric determination of cyclofenil using photochemical derivatization.** Talanta, 74(5), 1442, 2008.

REA L. **Chemical muscle enhancement**, Olympian's News, 2003.

ROSSI G, GABBI E, SERRA L. **Acute hepatitis induced by cyclofenil: a case report.** Ital J Gastroenterol. 24(2), 77, 1992.

RUSSELL M.L., SCHACHTER R. K.. **Cyclofenil-induced hemolytic anemia in scleroderma.** Acta medica Scandinavica 210, 431, 1981.

SKOOG, D. A., and LEARY, J. J., **High-Performance liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis.** Flórida, 1992.

SKOOG, W., HOLLER F. J., WEST D. M. **Fundamentos de química analítica.** São Paulo, Brasil, 2005.

SMITH, K. C. **Basic photochemistry**, disponível em: <http://www.photobiology.info/Photochem.html>. Acesso em 10 de maio de 2012.

VIM. **Vocabulário Internacional de metrologia.** Acesso em 2012.

WADA. **World Anti-doping Agency**, disponível em World Anti-doping Agency: <http://www.wada-ama.org/> Acesso em 28 de janeiro de 2012.

WADA. World Anti-doping Agency. **The World Anti-doping Code The 2012 Prohibited list international Standard**, 2012a.

WATERS, **Detector de fluorescência multi-comprimento de onda 2475**, disponível em: [http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=pt\\_BR&cid=514434](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=pt_BR&cid=514434). Acesso 12 de novembro de 2012.

WHO. World Health Organization, **Agents Stimulating Gonadal function in the Human** Geneva, 1973.

WHO. **World Health Organization**, disponível em <http://www.who.int/en/>. Acesso em 23 de maio de 2012

WHO. World Health Organization. **An Introduction to the World Health Organization 2007**, disponível em: <http://www.who.int/about/role/en/index.html>. Acesso em 10 dezembro de 2012.

**Anexos: Certificados de calibração da vidraria (balão volumétrico), balança analítica e micro pipeta (10 µL) (100-1000 µL).**

- I. Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico de 10,00 mL
- II. Certificado da calibração da balança analítica
- III. Certificado da calibração da micropipeta 10 µL.
- IV. Certificado da calibração da micropipeta 100 – 1000 µL

## I. Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico de 10,00 mL.

Calibração  
NBR ISO/IEC  
17025

Laboratório de  
**Caracterização de Fluidos**  
Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22453-900

**LCF**  
DEM/PUC-RIO

Tel: (21) 3527-1173  
Fax: (21) 3527-1165  
e-mail: lcf@mec.puc-rio.br  
http://www.mec.puc-rio.br/prof/pmendes/pageshtmlcf.html

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº VOL-009/07**

**CAL 0108**

**DADOS DO CLIENTE**

Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio  
Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

Nº O.S.: 001/07

Objeto: balão  
Tipo do objeto: volumétrico  
Fabricante: Quimex  
Nº identificação: 9  
Código Cliente: -  
Temp. de referência: 20°C  
Capacidade nominal: 10 mL  
Valor de uma divisão: -

**DADOS DA CALIBRAÇÃO**

Método: Segundo o Procedimento Interno PR-003 revisão 03, baseado na norma ABNT NB-3119, que consiste em determinar o peso do volume de água deionizada contido ou transferido.

Dados Ambientais:	Temp.	20.2°C	Umidade	58%	Pressão	762 mmHg
Picnômetro:	nº ident.	F523	nº cert.	VOL-873/06	LCF/DEM/PUC-Rio	
Termômetro:	nº ident.	MT307P000271 - Sensor 01	nº cert.	TE-2375/06	IFM	
Balança 1:	nº ident.	D2641118300117	nº cert.	DMQ 0674/2006	INMETRO	
Balança 2:	nº ident.	-	nº cert.	-	-	
Higrômetro:	nº ident.	21815	nº cert.	LTR 1702/05	VISOMES	
Barômetro:	nº ident.	0221	nº cert.	DMQ 0163/2005	INMETRO	

**RESULTADOS OBTIDOS**

volume nominal (mL)	volume a 20°C (mL)	U (mL)	k
10	10.050	0.003	2.02

U representa a incerteza expandida, e k o fator de abrangência.

Data da calibração: 09/01/07  
Data da emissão: 18/01/07

Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes  
Gerente Técnico

OBS: • Original c/ 01 cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Cgcre/Inmetro, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer lotes. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

## II. Certificado da calibração da balança analítica.



## SJS® Serviços Ltda

Rua: Dr. Nunes, 985, Olaria, Rio de Janeiro, RJ. Cep.: 21021-370  
 Tel.: (0xx21) 3867.0705 ou 3867.0805/ Fax: (0xx21) 3867.0650  
 CNPJ: 31.410.780/0001-71 / I.E.: 84.833.517  
 www.sjsservicos.com.br  
 e-mail: sjs@sjsservicos.com.br

Calibração  
NBR ISO/IEC  
17025



CAL 0418

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO DE BALANÇA Nº 0441/2011**  
 LABORATÓRIO ACREDITADO NA ÁREA DE MASSA SOB O Nº 0418

**SOLICITANTE:** FACULDADES CATÓLICAS ✓  
**ENDEREÇO:** Rua Marquês de São Vicente 225, Prédio Cardeal Leme, sala 283, Gávea, Rio de Janeiro - RJ ✓  
**CONTRATANTE:** O mesmo ✓  
**ENDEREÇO:** O mesmo ✓

**DADOS DA BALANÇA:**

**FABRICANTE:** Shimadzu ✓ **MODELO:** AUW 220 ✓ **NÚMERO DE SÉRIE:** D 450012328 ✓  
**IDENTIFICAÇÃO:** LEEA 035 ✓ **PATRIMÔNIO:** Não consta ✓  
**FAIXA DE INDICAÇÃO:** 82 g / 220 g ✓ **RESOLUÇÃO:** 0,00001 g / 0,0001 g ✓  
**LOCALIZAÇÃO:** Laboratório de Equipamento ✓ **CLASSE DE EXATIDÃO:** I ✓

**DADOS DA CALIBRAÇÃO:**

Padrões utilizados: A calibração da balança foi realizada usando os seguintes padrões:

Identificação	Certificado	Calibração	Validade
BAR 001	PR-2887/09	25/9/2009	2 anos
JP 008	MA 196_07_10	28/7/2010	2 anos
TH 002	LV 2534/11	2/2/2011	2 anos

**Condições ambientais:** A calibração da balança foi realizada conforme as condições ambientais abaixo:

Temperatura inicial: 22,3 °C ✓ Umidade inicial: 51 % ✓ Pressão atmosférica inicial: 1024 hPa ✓  
 Temperatura final: 22,1 °C ✓ Umidade final: 51 % ✓ Pressão atmosférica final: 1024 hPa ✓

**Procedimento:** Calibração realizada através do método de comparação direta de massa a partir dos padrões de referência rastreados à RBC - Rede Brasileira de Calibração e o equipamento.

**NOTAS:**

1. Este documento foi gerado de acordo com a IT 006 - Emissão de certificados de calibração.
2. Os padrões de massa em duplicidade são diferenciados com ponto nos de g e dobras nos de mg. Para identificação será utilizado o sem ponto em g e duas dobras em mg.
3. Os pesos de 20kg são usados na ordem crescente de sua numeração de identificação.
4. A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência k.
5. O presente certificado de calibração atende aos requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005 e é válido apenas para o equipamento acima, não sendo extensivo a qualquer outro instrumento de medição, ainda que similar.
6. Determinação da incerteza conforme ISO GUM.
7. A atividade de ajuste e excentricidade não fazem parte do escopo da acreditação.
8. Este certificado só poderá ser reproduzido na íntegra. A reprodução em partes requer autorização por escrita da SJS Serviços Ltda.
9. Esta calibração não isenta o mesmo de controle metrológico estabelecido na legislação vigente.
10. Não houve variação de temperatura superior a 2 °C, de umidade superior a 15 % ou de pressão atmosférica superior a 10 hPa entre as medições iniciais e finais.
11. A validade da calibração é condicionada ao local da calibração.

**Cópia Controlada**

MC/LB  
 F32.1/6 30/06/2011  
 Página 1 de 2



# SJS® Serviços Ltda

Rua: Dr. Nunes, 985, Olaria, Rio de Janeiro, RJ. Cep.: 21021-370

Tel.: (0xx21) 3867.0705 ou 3867.0805/ Fax: (0xx21) 3867.0650

CNPJ: 31.410.780/0001-71 / I.E.: 84.833.517

www.sjsservicos.com.br

e-mail: sjs@sjsservicos.com.br

Calibração  
NBR ISO/IEC  
17025



CAL 0418

## CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO DE BALANÇA Nº 0441/2011

LABORATÓRIO ACREDITADO NA ÁREA DE MASSA SOB O Nº 0418

### EXCENTRICIDADE

3 4  
1  
2 5

Massa utilizada: 100 g		
Indicação	Medição	Erro de medição
1	100,0001	-
2	100,0001	0,0000
3	100,0001	0,0000
4	100,0001	0,0000
5	100,0001	0,0000

### RESULTADO DA CALIBRAÇÃO

Valor nominal ( g )	Valor de referência ( g )	Valor de medição ( g )	Erro de medição ( g )	k	Incerteza expandida ± ( g )
0,001	0,000998	0,01000	0,00900	2,00	0,00001
0,1	0,100000	0,10000	0,00000	2,00	0,00001
0,5	0,500012	0,50001	0,00000	2,00	0,00002
1	0,999987	0,99999	0,00000	2,00	0,00003
10	10,000002	10,00000	0,00000	2,00	0,00004
20	20,000000	20,00000	0,00000	2,00	0,00004
50	49,999947	49,99995	0,00000	2,00	0,00010
100	100,00010	100,0001	0,0000	2,00	0,0002
150	150,000047	150,0000	0,0000	2,00	0,0002
220	220,000110	220,0000	-0,0001	2,00	0,0003

Indicação = valor de referência + erro de medição

DATA DA CALIBRAÇÃO: 19/9/2011

  
Marcelo Costa

Executante da Calibração

Se encaminhado por e-mail dispensa assinatura



Leandro Sampaio

Responsável Técnico

Se encaminhado por e-mail dispensa assinatura

*Cópia Controlada*

MC/LB

F32.1/6 30/06/2011

Página 2 de 2



## III. Certificado da calibração da micropipeta 10 µL

 CAL 0107	Laboratório de <b>Caracterização de Fluidos</b> Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900		LCF DEM/PUC-RIO		Tel: (21) 3527-1173 Fax: (21) 3527-1979 e-mail: lcf@puc-rio.br	
	<b>CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº MVO-038/10</b>					
DADOS DO CLIENTE						
Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio Endereço: Rua Marquês de São Vicente, 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900 N° O.S.: 084/10						
IDENTIFICAÇÃO DO INSTRUMENTO CALIBRADO						
Objeto: micropipeta Tipo do objeto: deslocamento de ar Fabricante: HT N° identificação: 948121444 Código Cliente: LEEA 070 Temp. de referência: 20°C Capacidade nominal: 10 µL Valor uma divisão: 0,1 µL Fabricante das ponteiros: Plastibrand Modo de pipetagem: normal						
						
DADOS DA CALIBRAÇÃO						
Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006, baseado na norma ISO 8655, que consiste em determinar o peso do volume de água deionizada contido ou transferido.						
Dados Ambientais:	Temp.	20,7°C	Umidade	65%	Pressão	1027 hPa
Picnômetro:	n° ident.	PC-3	n° cert.	VOL-183/10	LCF/PUC-Rio	
Termômetro:	n° ident.	TD520001816 - S2	n° cert.	TE-1288/10	FM	
Balança 1:	n° ident.	1122200582	n° cert.	20100350A	EBM	
Balança 2:	n° ident.	D2641118300117	n° cert.	20100349	EBM	
Termohigrômetro:	n° ident.	68734	n° cert.	LV-25176/09	VISOMES	
Barômetro:	n° ident.	0221	n° cert.	PS-01-235/10	SETTING	
RESULTADOS OBTIDOS						
	volume nominal (µL)	volume a 20°C (µL)	U (µL)	k		
	1	0,93	0,03	2,00		
	5	4,90	0,08	2,28		
	10	9,97	0,03	2,01		
U representa a incerteza expandida, e k o fator de abrangência.						
Data da calibração: 19/10/10 Data da emissão: 20/10/10						
 Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes Gerente Técnico						
OBS: • Original c/ 01 cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação da Cgcre/Inmetro, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer lotes. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.						

## IV. Certificado da calibração da micropipeta 100 - 1000 µL.

	Laboratório de <b>Caracterização de Fluidos</b> Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900		Tel: (21) 3527-1173 Fax: (21) 3527-1979 e-mail: lcf@puc-rio.br																																																		
	<b>CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO n° MVO-036/10</b>																																																				
DADOS DO CLIENTE																																																					
Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio Endereço: Rua Marquês de São Vicente, 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900 N° O.S.: 084/10																																																					
IDENTIFICAÇÃO DO INSTRUMENTO CALIBRADO																																																					
Objeto: micropipeta Tipo do objeto: deslocamento de ar Fabricante: HT N° identificação: 948163964 Código Cliente: LEEA 072 Temp. de referência: 20°C Capacidade nominal: 1000 µL Valor uma divisão: 1 µL Fabricante das ponteiros: Plastibrand Modo de pipetagem: normal																																																					
DADOS DA CALIBRAÇÃO																																																					
Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006, baseado na norma ISO 8655, que consiste em determinar o peso do volume de água deionizada contido ou transferido.																																																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Dados Ambientais:</th> <th>Temp.</th> <th>20,7°C</th> <th>Umidade</th> <th>65%</th> <th>Pressão</th> <th>1027 NPa</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Picnômetro:</td> <td>n° ident.</td> <td>PC-3</td> <td>n° cert.</td> <td>VOL-183/10</td> <td colspan="2">LCF/PUC-Rio</td> </tr> <tr> <td>Termômetro:</td> <td>n° ident.</td> <td>T0520001816 - S2</td> <td>n° cert.</td> <td>TE-1286/10</td> <td colspan="2">IPM</td> </tr> <tr> <td>Balança 1:</td> <td>n° ident.</td> <td>1122200582</td> <td>n° cert.</td> <td>20100350A</td> <td colspan="2">EBM</td> </tr> <tr> <td>Balança 2:</td> <td>n° ident.</td> <td>02641118300117</td> <td>n° cert.</td> <td>20100349</td> <td colspan="2">EBM</td> </tr> <tr> <td>Termohigrômetro:</td> <td>n° ident.</td> <td>68784</td> <td>n° cert.</td> <td>LV-25176/09</td> <td colspan="2">VISOMES</td> </tr> <tr> <td>Barômetro:</td> <td>n° ident.</td> <td>0221</td> <td>n° cert.</td> <td>PS-01-235/10</td> <td colspan="2">SETTING</td> </tr> </tbody> </table>					Dados Ambientais:	Temp.	20,7°C	Umidade	65%	Pressão	1027 NPa	Picnômetro:	n° ident.	PC-3	n° cert.	VOL-183/10	LCF/PUC-Rio		Termômetro:	n° ident.	T0520001816 - S2	n° cert.	TE-1286/10	IPM		Balança 1:	n° ident.	1122200582	n° cert.	20100350A	EBM		Balança 2:	n° ident.	02641118300117	n° cert.	20100349	EBM		Termohigrômetro:	n° ident.	68784	n° cert.	LV-25176/09	VISOMES		Barômetro:	n° ident.	0221	n° cert.	PS-01-235/10	SETTING	
Dados Ambientais:	Temp.	20,7°C	Umidade	65%	Pressão	1027 NPa																																															
Picnômetro:	n° ident.	PC-3	n° cert.	VOL-183/10	LCF/PUC-Rio																																																
Termômetro:	n° ident.	T0520001816 - S2	n° cert.	TE-1286/10	IPM																																																
Balança 1:	n° ident.	1122200582	n° cert.	20100350A	EBM																																																
Balança 2:	n° ident.	02641118300117	n° cert.	20100349	EBM																																																
Termohigrômetro:	n° ident.	68784	n° cert.	LV-25176/09	VISOMES																																																
Barômetro:	n° ident.	0221	n° cert.	PS-01-235/10	SETTING																																																
RESULTADOS OBTIDOS																																																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th>volume nominal (µL)</th> <th>volume a 20°C (µL)</th> <th>U (µL)</th> <th>k</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> <td>98,9</td> <td>0,6</td> <td>2,00</td> </tr> <tr> <td>500</td> <td>500,7</td> <td>0,9</td> <td>2,00</td> </tr> <tr> <td>1000</td> <td>1003</td> <td>2</td> <td>2,00</td> </tr> </tbody> </table>					volume nominal (µL)	volume a 20°C (µL)	U (µL)	k	100	98,9	0,6	2,00	500	500,7	0,9	2,00	1000	1003	2	2,00																																	
volume nominal (µL)	volume a 20°C (µL)	U (µL)	k																																																		
100	98,9	0,6	2,00																																																		
500	500,7	0,9	2,00																																																		
1000	1003	2	2,00																																																		
U representa a incerteza expandida, e k o fator de abrangência.																																																					
Data da calibração: 07/10/10 Data da emissão: 20/10/10																																																					
 Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes Gerente Técnico																																																					
OBS: • Original c/ 01 cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação da Cgcre/Inmetro, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer lotes. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.																																																					