

5 Método para a determinação seletiva de NOR na presença de LEV ou de CIP

5.1 Comentário preliminar

Nesse primeiro estudo de caso, decidiu-se por desenvolver um método fosforimétrico para a determinação seletiva de NOR em amostras contendo LEV e CIP. Para que isso fosse implementado, dois sais indutores de fosforescência, o acetato de cádmio e o nitrato de tório, foram testados e comparados. A escolha desses sais foi feita levando em consideração o desempenho relativo da fosforescência da NOR em relação às FQs concomitantes, principalmente evitando-se condições em que a quantidade molar equivalente de LEV não fornecesse sinal fosforescente muito superior ao da NOR, casos em que a determinação seletiva seria impossível devido à interferência causada pela magnitude do alargamento das bandas espectrais na temperatura ambiente da LEV no espectro da NOR.

Para cada sal de átomo pesado, o pH da solução carreadora de analito foi escolhido: pH 9 para depósito de solução em substratos contendo $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e pH 12 para depósito de solução em substratos contendo $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$. A escolha foi baseada na região de maior fosforescência observada para NOR em ambas as situações (Figura 4.4 e Figura 4.5). A partir dessas escolhas, um estudo univariado foi realizado no sentido de se encontrar a melhor faixa de trabalho de parâmetros críticos (massa depositada de SDS, massa depositada do sal de átomo pesado) para a realização dos estudos multivariados que culminaram na escolha das condições experimentais finais para a NOR. Nessas condições, os principais parâmetros de desempenho (limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, coeficiente angular e linear) para a NOR foram obtidos e uma avaliação da seletividade para determinação da NOR em amostras com diferentes quantidades de LEV e de CIP foi feita. Em seguida, foram selecionados os ajustes instrumentais e estratégias de varredura. A possibilidade da determinação seqüencial de LEV, usando as condições

otimizadas para a NOR, foi também avaliada. Nesse caso, alguns parâmetros de desempenho foram comparados com os obtidos para uma situação mais favorável para determinação de LEV. Por fim, testes de recuperação em amostras de medicamentos comerciais, medicamentos propositalmente contaminados e em urina foram realizados.

5.2

Estudos univariados para a NOR

Nesta etapa, o efeito de três fatores fundamentais para o aumento da magnitude da fosforescência foi estudado: (i) Composição da solução carreadora de analito, (ii) quantidade de sal de átomo pesado depositado no substrato e (iii) quantidade de SDS depositado no substrato para modificação da superfície da celulose. Este estudo foi feito de modo univariado, onde um fator foi variado enquanto os outros foram fixados em níveis previamente definidos.

5.2.1.

Volume de tampão na solução carreadora

Um fator importante a ser considerado em fosforimetria suportada em celulose, é a composição do sistema de solventes que influencia a magnitude do sinal observado. Como descrito anteriormente, esse efeito é decorrente da interação da solução carreadora com a superfície do papel, que dependendo da sua polaridade, influencia na abertura de poros de diferentes tamanhos, permitindo à solução adentrar diferentes camadas do substrato, por fim, influenciando a disponibilidade do analito à radiação de excitação. No entanto, quando se tem meio tamponado, como foi o caso das condições onde são observadas os maiores sinais da NOR na presença acetato de cádmio (pH 9) e de nitrato de tório (pH 12), o efeito da quantidade de tampão também tem que ser avaliado, não só por causa de sua influência na polaridade mas principalmente devido a formação de uma massa de cristais (decorrentes dos componentes do tampão) na área do substrato seco onde o analito é depositado. Essa formação cristalina pode aumentar o grau de rigidez do analito no substrato, minimizando os processos de desativação radiativa e, por consequência aumentando a fosforescência emitida.

Primeiramente, esse experimento foi realizado com soluções 5×10^{-5} mol L^{-1} de NOR contendo 5% de acetona, em volume, completando a solução com

volumes variados de água e de tampão Britton-Robinson (pH 12). Nesse complemento, a proporção do tampão foi variada de 10 a 50% (1 a 5 mL para um volume total de 10 mL). Uma massa de 600 μg de nitrato de tório ($5 \mu\text{L}$ de solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$) foi usado como indutor de fosforescência. O resultado mostrado na Figura 5.1 indica que o uso de 30% do tampão na solução carreadora provocou o maior sinal fosforescente da NOR em substrato sólido. Maiores proporções provocaram decréscimo relativo de sinal, provavelmente por causa do efeito filtro causado pelo excesso de cristais de componentes do tampão que bloqueiam a incidência de radiação de excitação do analito. O volume de 30% de tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhido para o prosseguimento do trabalho.

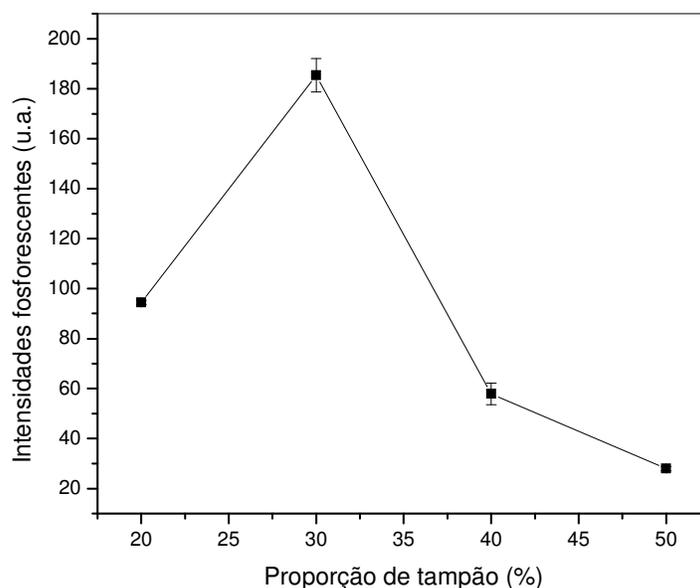


Figura 5.1. Efeito da proporção do tampão Britton-Robinson (pH 12) presente na solução carreadora de analito na fosforescência da NOR: Substrato de celulose contendo 80 ng de NOR e $1200 \mu\text{g}$ de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$.

A segunda etapa da escolha do sistema de solventes consistiu na escolha da proporção de acetona. Para tal, a proporção de acetona na solução $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NOR foi variada de 5 a 35% (0,5 a 3,5 mL de acetona em um volume total de 10 mL). Nesse caso, observou-se que o melhor sinal da faixa estudada foi obtido com 25 % de acetona, porém, para efeito prático da preparação de soluções, optou-se em utilizar 20% do solvente orgânico. Esse resultado e o anterior mostram a significativa influência da composição do sistema de solventes na técnica luminescente suportada em celulose. Como conclusão, o

sistema de solventes escolhido para os trabalhos com a NOR foi acetona/água/tampão (pH 9 ou pH 12) 20/50/30%, v/v/v. Esse tipo de efeito é independente do sal de átomo pesado utilizado, logo, a composição foi adotada para o sistema fosforescente induzido por acetato de cádmio.

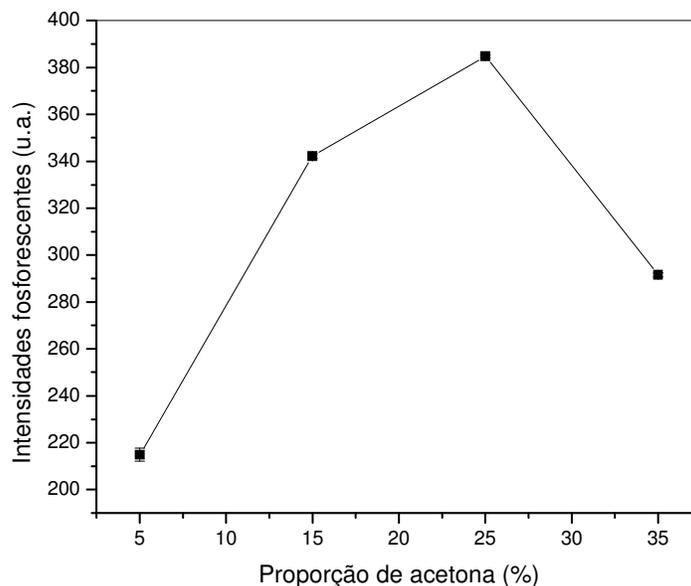


Figura 5.2 Influência da proporção de acetona na solução carreadora (pH 12) no sinal fosforescente de 80 ng de NOR em substrato sólido contendo 600 ng de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$.

5.2.2

Efeito da massa de sal de átomo pesado no substrato

Como demonstrado anteriormente, o efeito externo do sal de átomo pesado foi fundamental na indução de fosforescência da NOR, sendo mais eficazes os sais $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$. Vale lembrar que, o sal de átomo pesado atua aumentando a velocidade do cruzamento entre os estados excitados singleto e tripleto e a eficiência da desativação radiativa do estado tripleto (fosforescência). Sabendo que a magnitude da amplificação de sinal fosforescente é dependente da quantidade de indutor presente no substrato, foi necessário otimizar esse parâmetro experimental. Para tal, 5 μL de soluções de NOR ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em pH adequado foram depositadas em substratos de celulose, nos quais foram previamente aplicados 5 μL de soluções de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ ou de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ em diversas concentrações molares. Nesses experimentos uma única adição de 5 μL de solução de sal foi utilizada. Assim, a

massa máxima utilizada será dependente da molaridade máxima das soluções dos sais e das massas molares características de cada um. Nessa etapa, não foram testadas adições múltiplas ($n \times 5\mu\text{L}$) de solução de sal.

Na Figura 5.3 e na Figura 5.4 observam-se a influência da concentração destes sais de metais pesados na intensidade do sinal fosforescente de NOR.

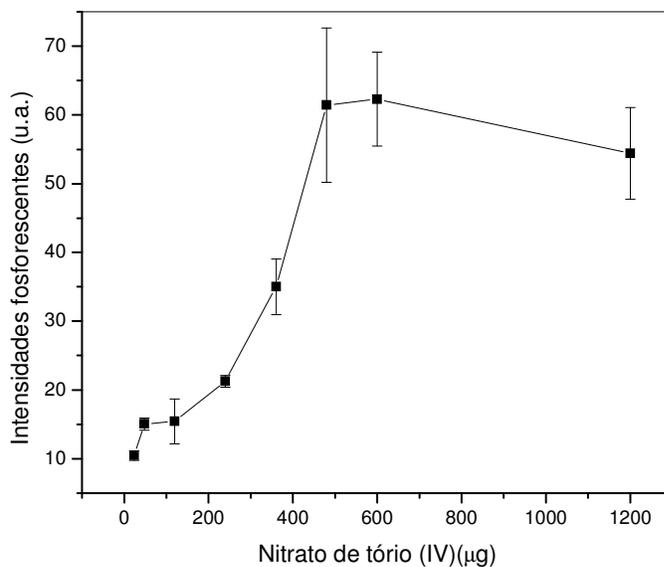


Figura 5.3. Estudo do efeito da massa de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ presente no substrato no sinal fosforescente da NOR. Solução carreadora de analito ajustada em pH 12.

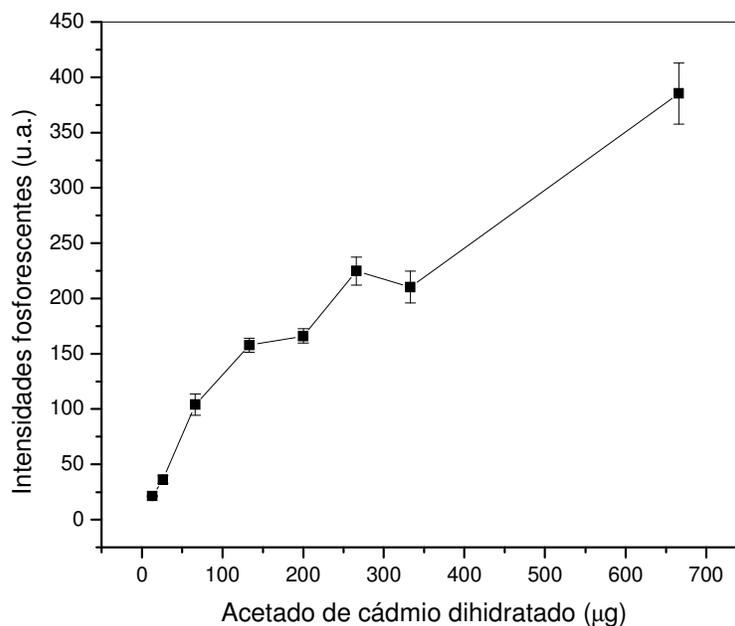


Figura 5.4. Estudo do efeito da massa de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ presente no substrato no sinal fosforescente da NOR. Solução carreadora de analito ajustada em pH 9.

De acordo com os resultados obtidos, sinais fosforescentes de NOR mais intensos foram observados na presença de 480, 600 e 1200 μg de nitrato de tório. Apesar do resultado com 1200 μg de sal de tório seja estatisticamente semelhante aos obtidos com 480 e com 600 μg , a tendência de decréscimo da curva pode estar indicando o início de um efeito filtro, que em geral ocorre quando grandes quantidades de sal estão presentes no local onde o analito é depositado. Já no caso do acetato de cádmio, a tendência é de crescimento da fosforescência da NOR com o aumento da massa de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ presente. Logo, a massa máxima do sal (666 μg) induziu fosforescência mais intensa. A tendência da curva indica que adições múltiplas da solução de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ podem ser benéficas no aumento de sinal da NOR. Mais adiante, nos estudos multivariados, esse efeito será avaliado.

5.2.3.

Efeito da massa de SDS usada como modificador de superfície

Muitos trabalhos têm reportado que a presença de modificadores de superfície proporciona uma amplificação de sinal fosforescente de espécies químicas principalmente devido a melhoria da interação entre o analito, sal de

átomo pesado e o substrato de celulose. No caso de surfactantes como o SDS, um contato mais eficiente entre o sal de átomo pesado e o analito pode ocorrer, amplificando o efeito externo que ocasiona o aumento da eficiência quântica fosforescente. Além disso, o SDS pode melhorar a rigidez do analito no substrato e impedir que o mesmo se infiltre por demais nas porosidades do papel, ficando indisponível para ser interrogado pela radiação de excitação. Esse efeito da modificação de superfície tem se mostrado bastante dependente da quantidade de surfactante no local onde a solução de analito é aplicada. Fosforescência induzida por sais de tálio e iodetos demonstram grande sensibilidade a esse fator.^{111,112}

Para estudar o efeito do SDS no sinal fosforescente da NOR induzido por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, substratos contendo diferentes quantidades de SDS foram testados. Novamente, apenas uma adição de 5 μl foi usada, implicando na limitação da massa mais elevada de SDS presente no substrato (360 μg) por causa da molaridade mais elevada de solução de SDS (0,25 mol L^{-1}). A Figura 5.5 e a Figura 5.6 mostram as variações de sinal da NOR obtidas com diferentes massas de SDS em substratos contendo sal de tório e de cádmio respectivamente.

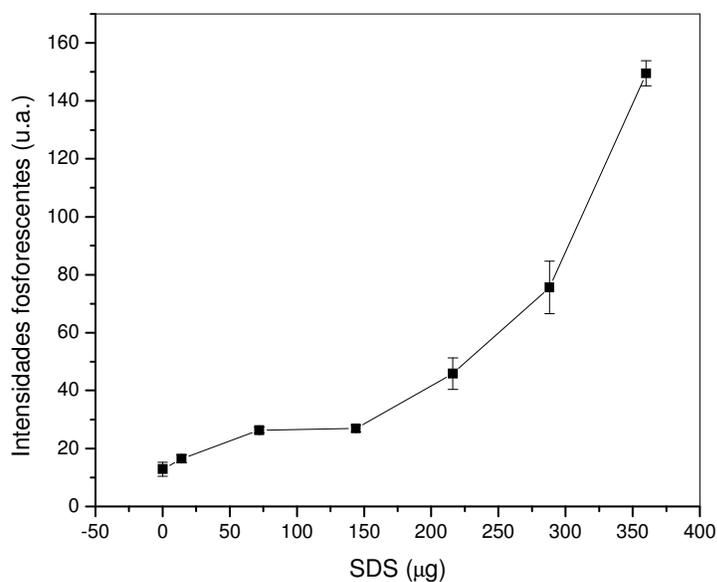


Figura 5.5. Estudo do efeito da massa de SDS presente no substrato no sinal fosforescente da NOR induzida por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$. Solução carreadora de analito ajustada em pH 12 e substrato contendo 600 μg de sal.

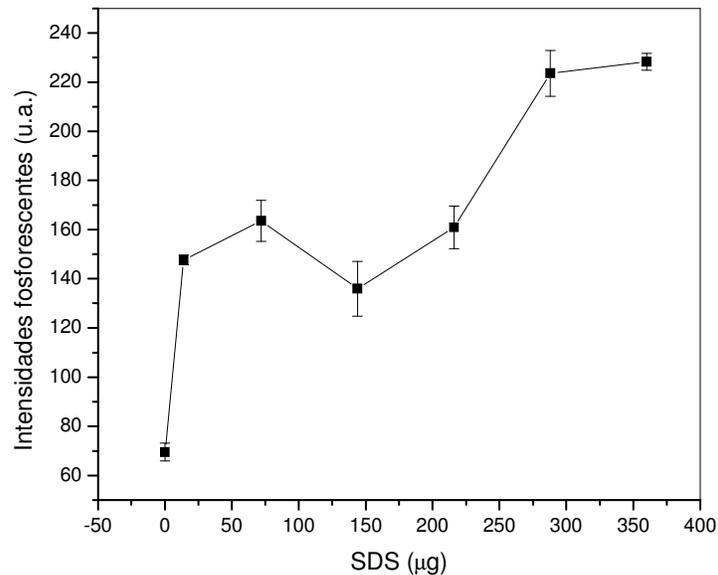


Figura 5.6. Estudo do efeito da massa de SDS presente no substrato no sinal fosforescente da NOR induzida por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$. Solução carreadora de analito ajustada em pH 9 e substrato contendo 666 µg de sal.

Os resultados mostraram que a quantidade de SDS no substrato afeta o sinal da NOR para os dois sais de átomos pesados utilizados. Dentro das faixas estudada, as tendências mostram que as maiores quantidades de SDS produzem as maiores ampliações de sinal, sendo que para o $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, o sinal é em torno de oito vezes maior com 360 µg de SDS quando comparado com a situação na ausência do surfactante. Nesse caso, a tendência também indica que múltipla adição de SDS pode vir a provocar um aumento ainda maior de sinal. Para o sinal da NOR induzido por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ a amplificação foi bem mais modesta sendo que o sinal máximo foi atingido antes da massa máxima de SDS.

5.3 Estudos multivariados para a NOR

A partir dos resultados do estudo univariado, foram estabelecidas as faixas de trabalho para o estudo multivariado (utilizando o programa Statistica 6.0) a ser apresentado nessa seção. De fato, o estudo multivariado foi realizado por três motivos, o primeiro foi o de identificar quaisquer tipos de interações relevantes entre parâmetros (fatores). O segundo foi realizar um ajuste dos valores dos parâmetros experimentais a serem selecionados como parte da condição selecionada para medição de sinal fosforescente da NOR, e em

terceiro lugar, obter uma idéia da faixa de robustez para cada parâmetro. O planejamento fatorial 2^3 (onde 2 são os níveis utilizados para cada um dos 3 fatores escolhidos) foi o escolhido. Os níveis mínimo e máximo para cada fator foram selecionados com base nas condições de contorno ou da indicação de tendências dos estudos univariados de (1) quantidade de SDS, (2) quantidade de sal de átomo pesado e (3) faixa de pH, baseado nos resultados preliminares do capítulo anterior. Na Tabela 5.1 são mostrados os níveis mais baixos (-) e mais altos (+) para cada fator, sendo que o estudo foi realizado para ambos os sais indutores de fosforescência.

Tabela 5.1 Fatores e níveis escolhidos para o estudo multivariado do efeito na fosforescência da NOR.

Cd(OAc) ₂		Th(NO ₃) ₄	
$\lambda_{exc} \backslash \lambda_{em} = 285 \backslash 443 \text{ nm}$		$\lambda_{exc} \backslash \lambda_{em} = 285 \backslash 467 \text{ nm}$	
Nível		Nível	
Parâmetro	mínimo(-) máximo(+) "Faixa de trabalho"	Parâmetro	mínimo(-) máximo(+) "Faixa de trabalho"
(1) pH	9(-) – 10(+)	(1) pH	11(-) – 12(+)
(2) Massa Cd(OAc) ₂ (μg)	333(-) – 999(+)	(2) Massa de sal Th(NO ₃) ₄ (μg)	480(-) – 600(+)
(3) Massa de SDS (μg)	290(-) – 360(+)	(3) Massa de SDS (μg)	360(-) – 720(+)

No caso da quantidade de SDS na presença de acetato de cádmio assim como no caso da massa de Th(NO₃)₄, a dupla adição de solução de maior molaridade foi testada por causa da tendência de subida de fosforescência da NOR no limite das massas referente a uma única adição das respectivas soluções.

Os 16 experimentos na presença de Cd(OAc)₂ foram planejados conforme mostrado na Tabela 5.2 e realizados na ordem aleatória indicada e em duplicatas autênticas (usando soluções independentes de analito para cada replicata). Os sinais fosforescentes obtidos em cada experimento são mostrados na última coluna da Tabela.

Tabela 5.2 Tabela de resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2^3 usando $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ como sal indutor de fosforescência da NOR.

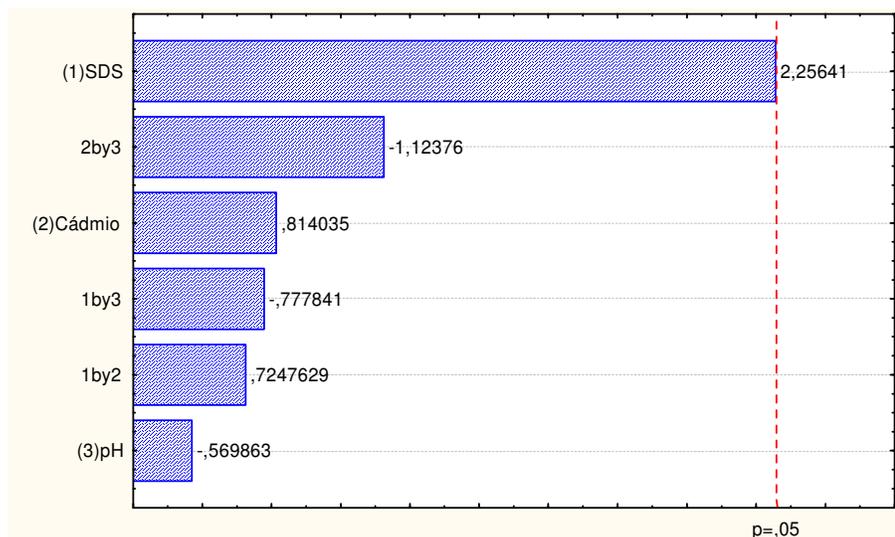
Ordem	Experimento	replicata	SDS (μg)	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$ (μg)	pH	Resultado ^a (ua)
1	6	1	290	333	10	693
2	2	1	290	333	9	335
3	4	1	290	999	9	551
4	3	1	360	999	9	262
5	12	2	290	999	9	1692
6	9	2	360	333	9	318
7	16	2	290	999	10	514
8	5	1	360	333	10	218
9	10	2	290	333	9	598
10	14	2	290	333	10	627
11	1	1	360	333	9	337
12	8	1	290	999	10	480
13	11	2	360	999	9	321
14	13	2	360	333	10	403
15	15	2	360	999	10	400
16	7	1	360	999	10	349

^a Fosforescência da NOR em unidades arbitrárias (ua)

A representação gráfica desses resultados pode ser observada na forma de gráfico de Pareto (Figura 5.7) que indica de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente significantes no modelo. Pelo gráfico de Pareto, as barras que por ventura ultrapassam a linha divisória (nível de confiança $p = 0,05$) indicam parâmetros significantes no modelo e que ainda precisam ser ajustados para a obtenção da condição ótima. O número a frente de cada barra representa o valor experimental da distribuição t de Student. Pode-se observar que dentro da faixa escolhida, todas as interações entre fatores são insignificantes. Os fatores isolados parecem também não ter significância considerando os níveis escolhidos, indicando que os parâmetros são robustos dentro das faixas selecionadas. Uma dúvida pode ser levantada em relação à significância do fator quantidade de SDS no modelo escolhido, pois a barra que representa esse fator se encontra em cima da linha vermelha. Assim, um resultado de teste ANOVA (gerado simultaneamente com o gráfico de Pareto) mostrou que o $F_{(0,05;1;9)}$

experimental (5,09) foi menor que o valor crítico tabelado ($F_{(0,05,1,9)} = 5,12$) indicando que este parâmetro não precisa ser ajustado. Logo, o resultado mostra dentro de uma confiabilidade de 95% que o modelo usado é robusto e não precisa de refinamento.

Interpretando esse resultado pode-se concluir que não existem diferenças se o pH da solução carreadora for ajustado entre 9 e 10, e as massas depositadas de SDS estiverem entre 290 e 360 μg . Com relação à quantidade de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, uma observação mais cuidadosa tem que ser feita, como os sinais fosforescentes obtidos com 333 e com 999 μg são estatisticamente iguais, e pela curva de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ o sinal da NOR é estatisticamente maior com 666 μg do que com 333 μg do sal, isso indica que 666 μg de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ (uma adição de solução de 5 μL de solução 0,5 mol L^{-1}) estaria na região de máximo da faixa de valores de massa que promoveriam a indução máxima de fosforescência da NOR. Assim, o valor de 666 μg foi selecionado.



Estimativa dos efeitos (valor absoluto)

Figura 5.7. Gráfico de Pareto gerado com base no sinal fosforescente da NOR na presença de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$. As barras marcadas 1 by 2; 1 by 3; 2 by 3 indicam as interações entre os fatores, sendo 1 (SDS); 2 (sal de átomo pesado) e 3 (pH).

Seguindo a mesma linha de raciocínio usado na otimização do sinal da NOR com o uso do $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, a otimização com o $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ também foi realizada. Na Tabela 5.3 se encontram as condições escolhidas para o

planejamento fatorial 2^3 e os resultados dos 16 experimentos de medição de fosforescência da NOR. Nos casos do pH e da massa de sal, utilizou-se faixas próximas do resultado máximo do estudo univariado com o intuito de se avaliar a robustez dos fatores. Já para o SDS, o estudo univariado mostrou que uma segunda adição de SDS deve ser testada, logo uma (360 μg) e duas (720 μg) adições foram respectivamente selecionados os níveis mínimo e máximo para o fator.

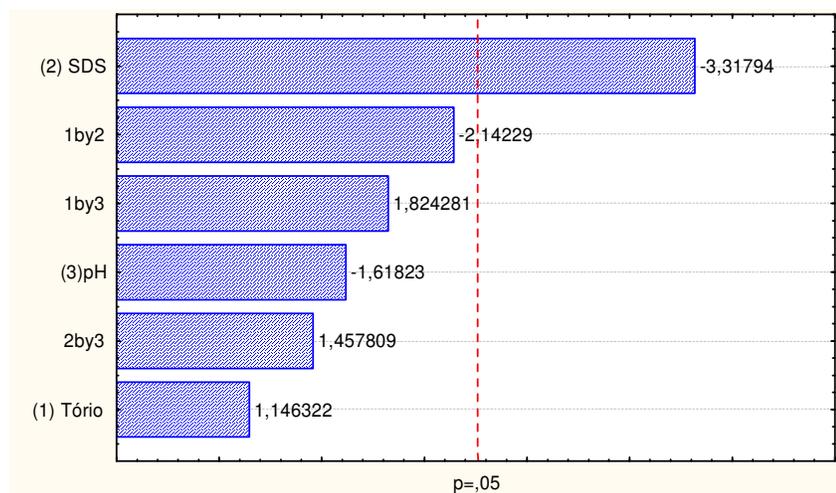
O gráfico de Pareto resultante desse planejamento é mostrado na Figura 5.8. e indica a não relevância das interações entre fatores dentro das faixas estudadas, e a robustez para as faixas do pH e de massa de tório a serem utilizadas. Para a massa de SDS no substrato, o resultado do gráfico indicou a necessidade de ajuste, confirmada pelo resultado da ANOVA que indicou um $F_{(0,05;1;9)}$ experimental para esse fator igual a 11, muito superior ao $F_{(0,05;1;9)}$ crítico. O gráfico de Pareto indicou um valor de sinal negativo para a barra, o que significou que o ajuste da quantidade ótima de SDS deveria ser feito com a diminuição da massa a partir de 720 μg . No entanto, como se está trabalhando com adições múltiplas da solução mais concentrada de sal, a decisão ficou limitada ao uso de uma ou duas adições. Assim, nesse caso fica claro que a escolha será por utilizar uma adição (360 μg de SDS).

Na Tabela 5.4 são resumidas as condições experimentais escolhidas para a determinação fosforimétrica de NOR. Já na Figura 5.9 e na Figura 5.10 são mostrados os espectros fosforescentes da NOR obtidos nas condições escolhidas. Nessas mesmas condições experimentais para a determinação da NOR, os espectros da LEV são mostrados (Figura 5.11 e Figura 5.12).

Tabela 5.3 Tabela de resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2^3 usando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ como sal indutor de fosforescência da NOR.

Ordem	Experimento	replicata	SDS (μg)	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ (μg)	pH	Resultado ^a (ua)
1	6	1	360	600	12	124
2	12	2	720	600	11	77
3	2	1	360	600	11	146
4	15	2	720	480	12	108
5	5	1	360	480	12	98
6	16	2	720	600	12	115
7	8	1	720	600	12	109
8	13	2	360	480	12	106
9	10	2	360	600	11	170
10	9	2	360	480	11	139
11	14	2	360	600	12	153
12	3	1	720	480	11	98
13	11	2	720	600	11	146
14	1	1	360	480	11	134
15	7	1	720	480	12	84
16	4	1	720	600	11	100

^a Fosforescência da NOR em unidades arbitrárias (ua)



Estimativa dos efeitos (valor absoluto)

Figura 5.8. Gráfico de Pareto gerado com base no sinal fosforescente da NOR na presença de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$. As barras marcadas 1 by 2; 1 by 3; 2 by 3 indicam as interações entre os fatores, sendo 1 (SDS); 2 (sal de átomo pesado) e 3 (pH).

Tabela 5.4. Condições escolhidas para a determinação fosforimétrica de NOR.

Parâmetro	Sal de átomo pesado	
	$\lambda_{\text{exc}} \backslash \lambda_{\text{em}}$	
	Acetato de cádmio 285\443 nm	Nitrato de tório 285\467 nm
pH	9	12
Massa de sal no substrato	666 μg	480 μg
Massa de SDS no substrato	290 μg	360 μg

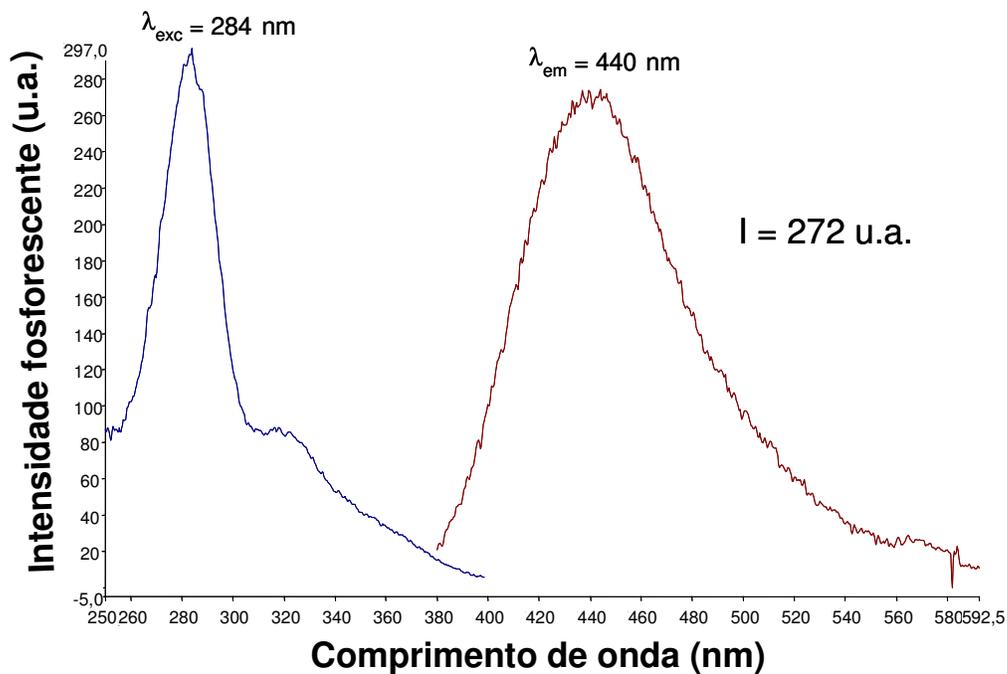


Figura 5.9 Espectro fosforescente de 80 ng de NOR em substrato de celulose contendo 666 μg de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e 290 μg de SDS. Solução carreadora em pH 9.

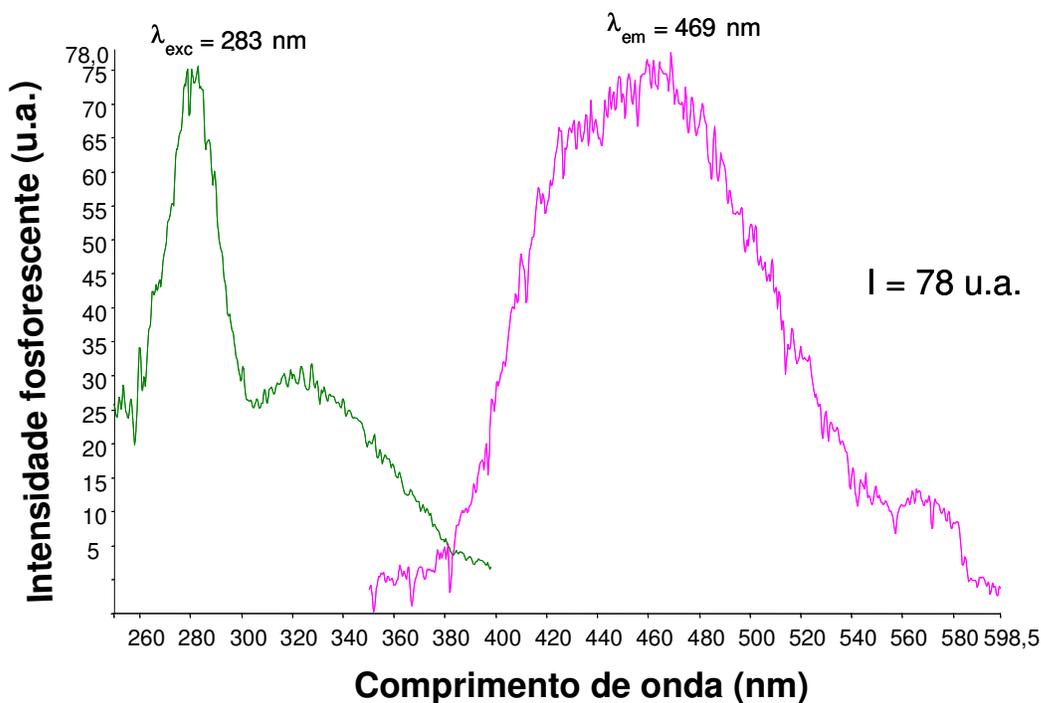


Figura 5.10 Espectro fosforescente de 80 ng de NOR em substrato de celulose contendo 480 μg de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e 290 μg de SDS. Solução carreadora em pH 9.

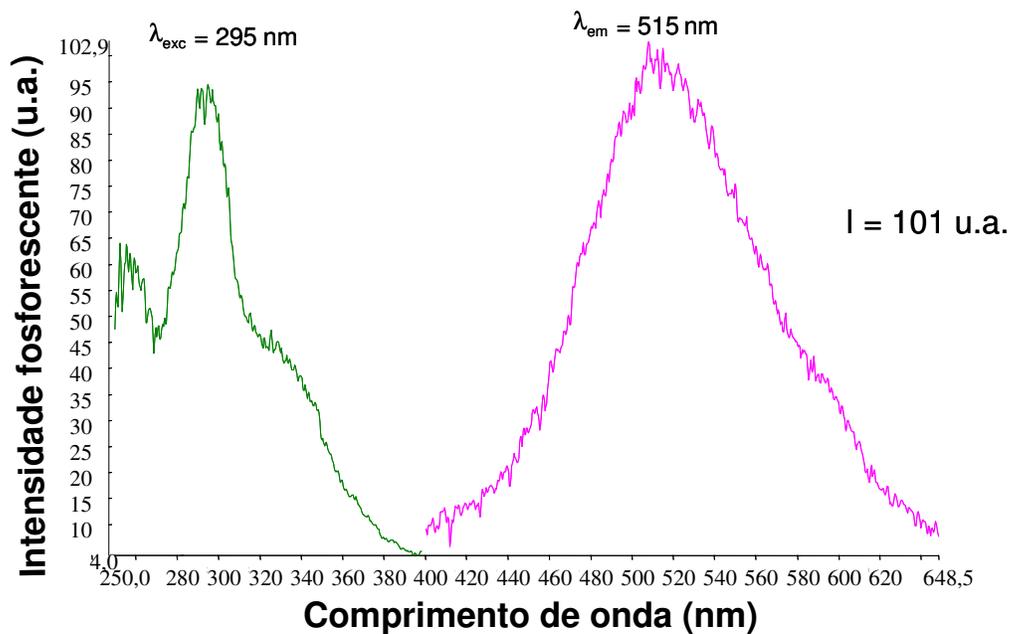


Figura 5.11. Espectro fosforescente de 90 ng de LEV em substrato de celulose contendo 666 μg de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e 290 μg de SDS. Solução carreadora em pH 9.

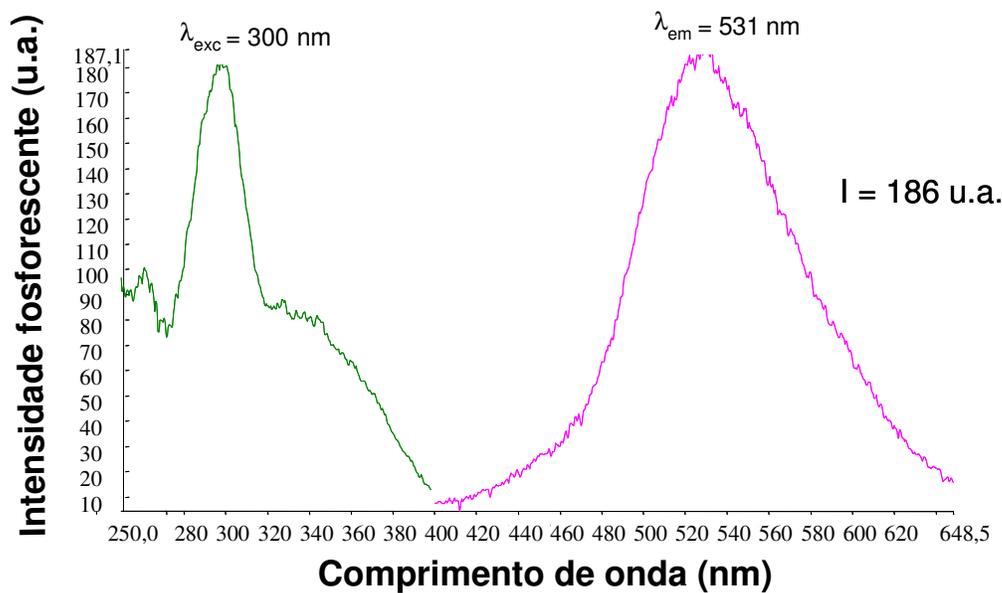


Figura 5.12. Espectro fosforescente de 90 ng de LEV em substrato de celulose contendo 480 μg de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e 290 μg de SDS. Solução carreadora em pH 9.

5.4

Otimização de condições experimentais para LEV visando a comparação de parâmetros de mérito com o método de determinação seqüencial de NOR e de LEV

Baseados nos estudos preliminares, as condições otimizadas para a NOR potencialmente permitirão também a observação do sinal fosforescente da LEV. Essa afirmação é fundamentada na diferença entre as bandas espectrais de excitação e de emissão das duas FQs que possuem diferentes valores de $\lambda_{exc} \setminus \lambda_{em}$. Tal diferença espectral pode vir a permitir, após ajustes instrumentais e da escolha do modo de varredura, a determinação seqüencial de NOR e de LEV. Na seção seguinte isso será avaliado e demonstrado. Se isto for possível, a determinação da LEV poderá ser feita nas condições escolhidas para a NOR, mesmo estas não sendo propriamente as ideais para a determinação da LEV. Nesse caso, uma comparação entre parâmetros de mérito para a LEV, obtidos na condição de determinação seqüencial com os obtidos numa condição considerada ideal, deverá ser feita para que se possa avaliar criticamente o desempenho do método proposto.

Nos estudos preliminares observou-se que a LEV apresentou melhores resultados com o uso do sal de chumbo ou de tálio, sendo que nesse trabalho optou-se pelo uso do nitrato de tálio como base para o método fosforescente ideal para a determinação de LEV. Assim, a otimização de método para a LEV foi feita por meio de um estudo univariado seguido de uma avaliação multivariada, nos moldes já indicados acima. Os estudos preliminares indicaram que o pH 9 deveria ser o escolhido para as soluções carreadoras nos experimentos univariados de massa de sal e de SDS.

Para o estudo com massa de sal (Figura 5.13), os resultados com apenas uma adição mostraram a tendência de aumento de sinal da LEV quando do uso da solução com máxima concentração de $TiNO_3$ (5 μL de solução 0,25 mol L^{-1} ou 333 μg de sal), assim, ao contrário do que foi feito nos casos anteriores, decidiu-se construir uma curva de múltiplas adições para se determinar a massa para indução de sinal máximo de fosforescência da LEV. Vale salientar aqui que isso foi feito apenas porque se quer avaliar parâmetros de mérito com uma condição assumida como ideal para a LEV. Em situações de análises de rotina, adições múltiplas acima de duas torna o procedimento experimental muito demorado e de difícil controle devido o espalhamento da solução para fora da região central onde o analito é depositado e onde a radiação de excitação incide no substrato. Os resultados mostraram que o sinal fosforescente máximo foi obtido com quatro

adições seqüenciais de 5 μL da solução 0,25 mol L^{-1} de TlNO_3 ou seja 1332 μg de sal.

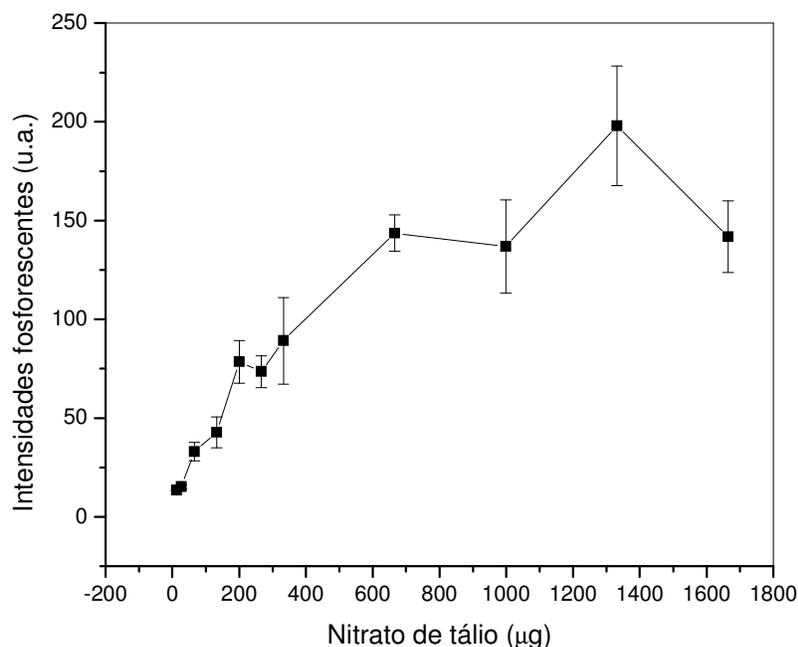


Figura 5.13. Estudo do efeito da massa de TlNO_3 presente no substrato no sinal fosforescente da LEV. Solução carreadora de analito ajustada em pH 9.

Para SDS (Figura 5.14), os resultados mostraram um aumento de sinal até a presença de 218 μg do surfactante, sendo os sinais obtidos estatisticamente semelhantes até a massa de 360 μg (limite para uma adição de SDS), devido ao coeficiente de variação relativamente alto nesse experimento (até 15%). Os valores altos de coeficiente de variação foram provavelmente provocados pela grande variação de massa de TlNO_3 na região de interrogação da radiação, provocada pelo uso de quatro adições múltiplas de solução do sal.

Com base nos resultados, as faixas de trabalho foram escolhidas para o estudo multivariado. Os níveis escolhidos foram: 218 μg (-) e 290 μg (+) para SDS; pH 8 (-) e pH 10 (+); 996 μg , ou 3 adições, (-) e 1660 μg , ou 5 adições (+) para TlNO_3 (ver Tabela 5.5 para os resultados dos 16 experimentos).

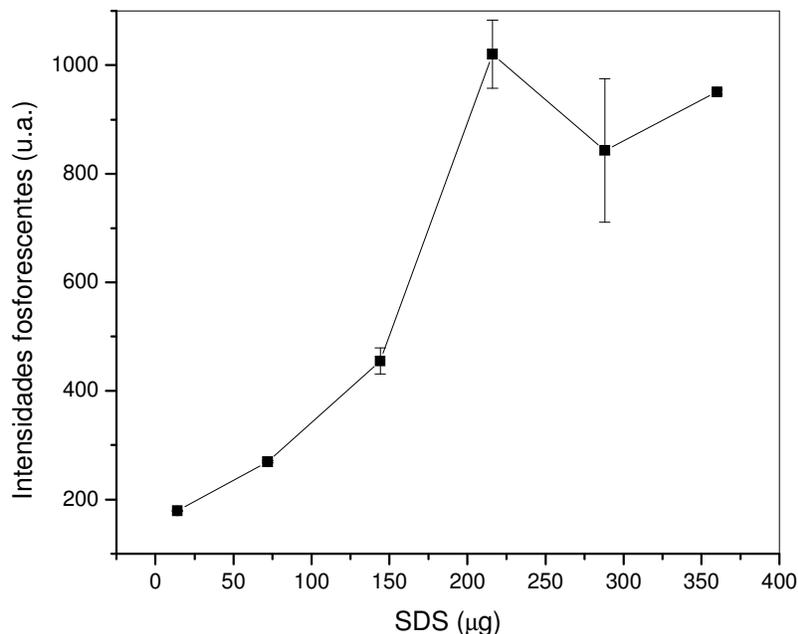


Figura 5.14. Estudo do efeito da massa de SDS presente no substrato no sinal fosforescente da NOR induzida por TINO_3 . Solução carreadora de analito ajustada em pH 9 e substrato contendo 1332 µg de sal.

Os resultados do estudo multivariado foram mostrados graficamente na Figura 5.15, onde se viu que, dentro das faixas escolhidas, as interações são irrelevantes e as faixas, com exceção da de TINO_3 são robustas. No caso do sal de átomo pesado, seria esperado um resultado abaixo do nível de significância de acordo com os dois níveis escolhidos, o que indicaria que o uso do valor do meio da faixa (4 adições) deveria ser o escolhido como mostrado no experimento univariado. No entanto, o experimento indicou a redução da massa de sal. Com o intuito de se eliminar qualquer dúvida com relação a essa otimização, um novo estudo univariado para o TINO_3 foi feito, agora usando a quantidade ótima de SDS além do pH 9 já utilizado no estudo univariado anterior. Apenas as adições múltiplas de solução de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ foram usadas. O resultado (Figura 5.16) mostrou agora que o melhor resultado foi atingido com três adições (999 µg de sal), de acordo com a tendência apontada pelo estudo multivariado. Vale salientar que nesse experimento em particular os desvios padrões para cada ponto foram baixos (não mais que 0,66%) indicando a diferença estatística relevante entre os pontos da curva. Esse nível de desvio foi obtido nesse experimento, especificamente, pois após cada adição de solução de sal, foi permitido que o substrato secasse totalmente, evitando o espalhamento de

solução. O espectro fosforescente da LEV (com filtro de atenuação para 25% do sinal original) nas condições otimizadas para uso de TINO_3 como sal indutor é mostrado na Figura 5.17.

Tabela 5.5 Tabela de resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2^3 usando TINO_3 como sal indutor de fosforescência da LEV.

Ordem	Experimento	replicata	SDS (μg)	TINO_3 (μg)	pH	Resultado ^a (ua)
1	4	1	290	1660	8	2460
2	10	2	290	999	8	8774
3	14	2	290	999	10	6535
4	8	1	290	1660	10	5419
5	6	1	290	999	10	6738
6	1	1	218	999	8	3909
7	12	2	290	1660	8	2490
8	16	2	290	1660	10	4139
9	2	1	290	999	8	6926
10	5	1	218	999	10	5533
11	9	2	218	999	8	6391
12	3	1	218	1660	8	2761
13	11	2	218	1660	8	5178
14	15	2	218	1660	10	4287
15	7	1	218	1660	10	4087
16	13	2	218	999	10	8398

^a Fosforescência da NOR em unidades arbitrárias (ua)

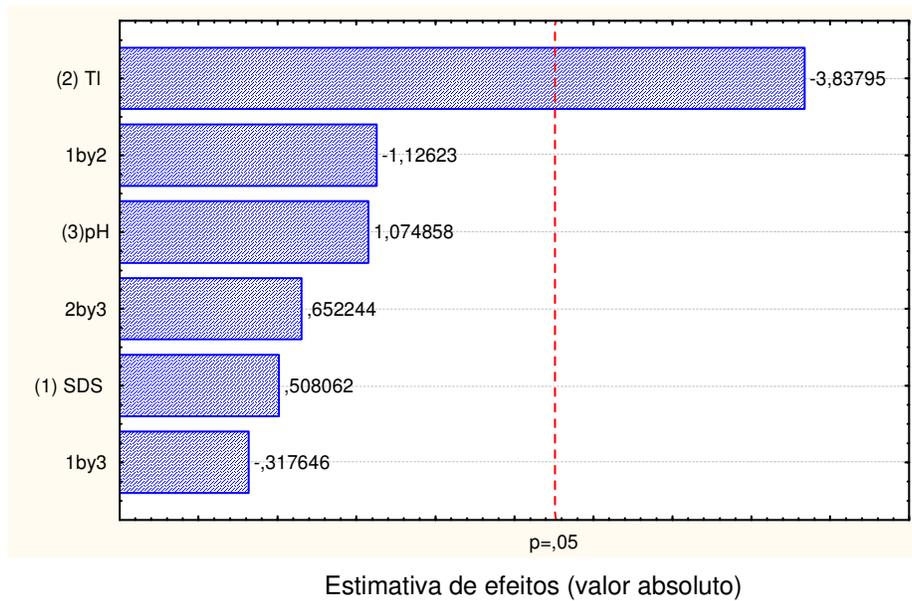


Figura 5.15. Gráfico de Pareto gerado com base no sinal fosforescente da LEV na presença de TlNO_3 . As barras marcadas 1 by 2; 1 by 3; 2 by 3 indicam as interações entre os fatores, sendo 1 (SDS); 2 (sal de átomo pesado) e 3 (pH).

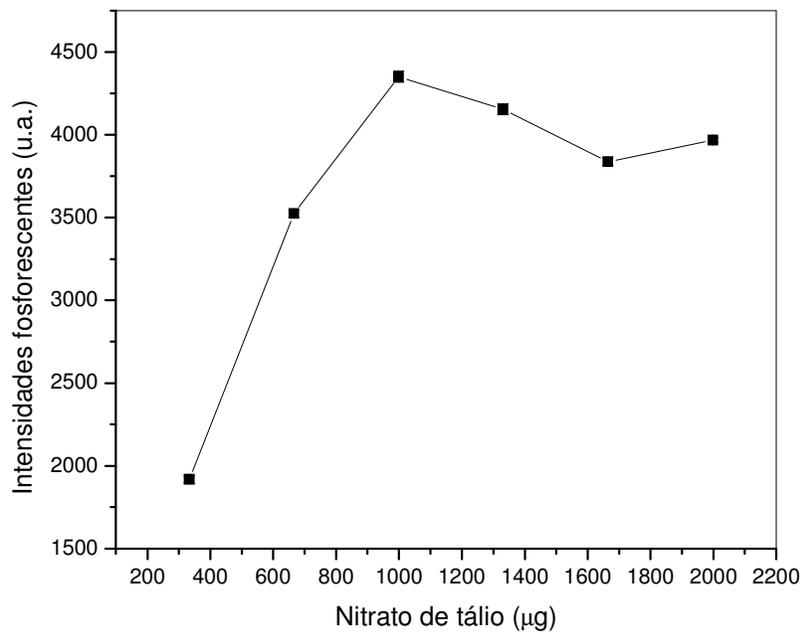


Figura 5.16. Reavaliação do estudo do efeito da massa de TlNO_3 presente no substrato no sinal fosforescente da LEV. Solução carreadora de analito ajustada em pH 9 e substratos contendo 218 μg de SDS.

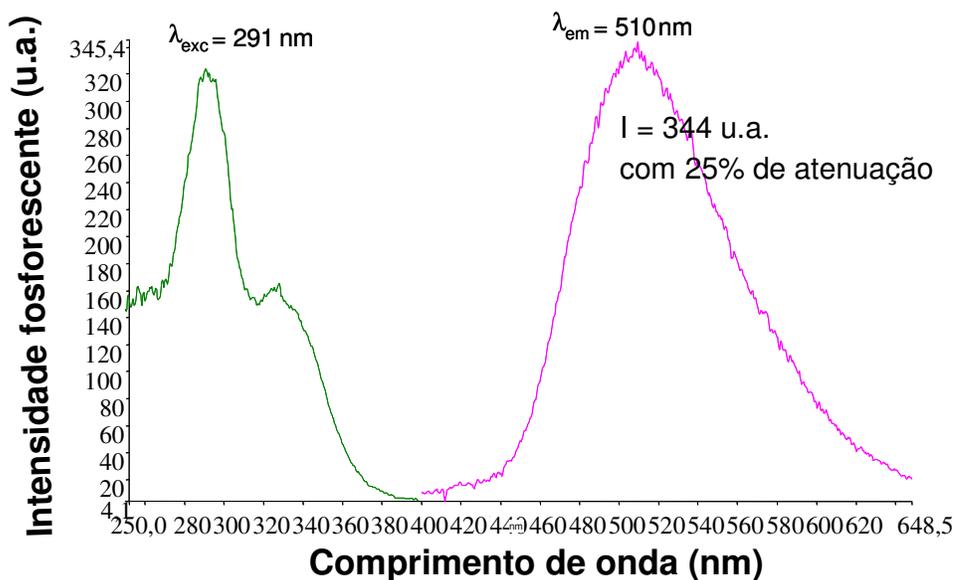


Figura 5.17. Espectro fosforescente de 90 ng de LEV em substrato de celulose contendo 999 μg de TINO_3 e 218 μg de SDS. Solução carreadora em pH 9.

5.5 Estudos de interferência no sinal da NOR

Estudos para a avaliação do potencial interferente das FQs (CIP, LEV, MOX, GAT) e da matriz urina foram realizados com o intuito de se estabelecer estratégias para a determinação de NOR em misturas contendo FQs ou em uma matriz biológica. As condições de indução de fosforescência utilizando $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ foram testadas e comparadas.

No caso da avaliação de interferências das FQs, os sinais fosforescentes de padrões da NOR foram comparados com os sinais fosforescentes obtidos de misturas contendo NOR e uma outra FQ presente em quantidades crescentes, até dez vezes maiores, em mol L^{-1} em solução ou em mol no substrato. Esses valores de sinal foram comparados na forma de razão $I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{Fluorq}})$, onde o índice fluorq se referiu a presença da FQ interferente. Ausência de interferência foi indicada quando o resultado dessa razão ficou próximo da unidade. Por lado, interferência espectral foi indicada quando o sinal da mistura foi maior que o sinal de padrão da NOR, isto é, a razão $I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{Fluorq}})$ foi menor que 1. Quando razões $I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{Fluorq}})$ foram maiores que 1 tem-se uma interferência não-espectral com queda de sinal da NOR, provocado provavelmente por efeito

filtro ou por obstrução da interação entre as moléculas da NOR com o sal indutor de fosforescência provocada pela maior quantidade da FQ concomitante.

Em todos os casos, a varredura no modo sincronizado foi utilizada com o intuito de minimizar possíveis interferências provocadas por bandas espectrais das substâncias concomitantes. Como dito anteriormente no Capítulo 2, esse tipo de varredura só é eficiente quando a diferença entre os λ_{exc} e λ_{em} ($\Delta\lambda$) do analito e das substâncias potencialmente interferentes são razoavelmente diferentes. Assim, ajustando o $\Delta\lambda$ para o valor referente ao analito, maximiza-se o sinal da substância de interesse, minimizando a contribuição das substâncias concomitantes na amostra. O espectro obtido com esse modo de varredura é de banda única que aparece, no caso do instrumento utilizado nesse estudo, na região da banda de excitação. Outra vantagem da varredura sincronizada é a diminuição da FWHM da banda espectral, o que pode facilitar a resolução espectral entre espectros muito próximos.

5.5.1. Estudos de interferência da CIP

Nas condições escolhidas para a NOR utilizando $Cd(OAc)_2$, a CIP apresentou sinal fosforescente relativamente pequeno em 288/468 nm, significando sobreposição com as bandas espectrais de excitação e de emissão da NOR (284/440 nm). Esse comportamento implicou em interferência espectral no sinal da NOR nas misturas contendo CIP em todas as proporções testadas, como pode ser visto na Tabela 5.6. Esta interferência foi significativa mesmo nas misturas contendo quantidades equimolares de NOR e de CIP. Esse resultado pode ser observado nos espectros da Figura 5.18, onde os valores em parênteses indicam a quantidade de NOR ou CIP em nmol.

Tabela 5.6. Estudo de interferência^a da CIP no sinal fosforescente da NOR usando $\text{Cd}(\text{OAc})_2$.

Proporção NOR ^b :CIP	Fosforescência (u.a.)	$I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{CIP}})$
1:0	$81,7 \pm 5,7$	1,0
1:1	$116,6 \pm 7,9$	0,70
1:2	$139,4 \pm 9,6$	0,59
1:5	$151,1 \pm 7,2$	0,54
1:10	$172,6 \pm 8,1$	0,47

^aQuantidade de NOR depositada no substrato: 0,25 nmol.

^bBanda espectral de passagem de 10 nm.

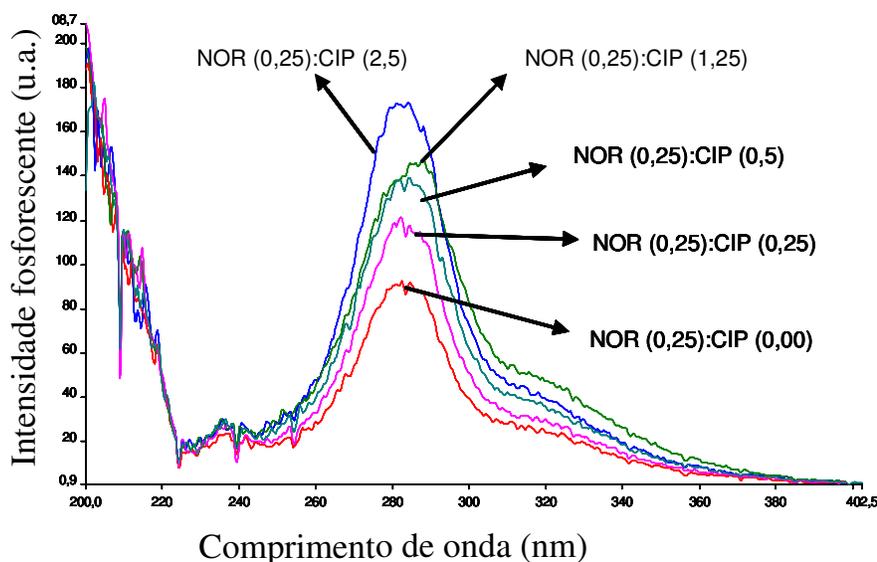


Figura 5.18. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da CIP no sinal da NOR com $\text{Cd}(\text{OAc})_2$: $\Delta\lambda = 150 \text{ nm}$ e velocidade de varredura de 600 nm min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

Nas condições de indução de fosforescência da NOR por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ não se observou sinal fosforescente para a CIP, indicando uma situação muito favorável do ponto de vista seletivo. Nesse caso, os resultados do estudo mostraram ausência de interferências para misturas contendo até cinco vezes mais quantidade de CIP. Para misturas contendo dez vezes mais CIP, interferência espectral foi observada provavelmente por causa de um sinal fosforescente nos substratos contendo grandes quantidades dessa substância

concomitante. Esse resultado pode ser observado na Tabela 5.7 e nos espectros da Figura 5.19, onde os valores em parênteses indicam a quantidade de NOR ou CIP em nmol.

Os resultados mostraram claramente a vantagem do emprego do nitrato de tório como indutor seletivo de fosforescência em misturas contendo CIP.

Tabela 5.7. Estudo de interferência^a da CIP no sinal fosforescente da NOR usando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$.

Proporção NOR ^b :CIP	Fosforescência (u.a)	$I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{CIP}})$
1:0	$119,3 \pm 8,3$	1
1:1	$115,6 \pm 6$	1,03
1:2	$115,6 \pm 5,7$	1,03
1:5	$114,7 \pm 4$	1,04
1:10	$166,8 \pm 7,9$	0,72

^aQuantidade de NOR depositada no substrato: 0,25 nmol.

^bBanda espectral de passagem de 10 nm.

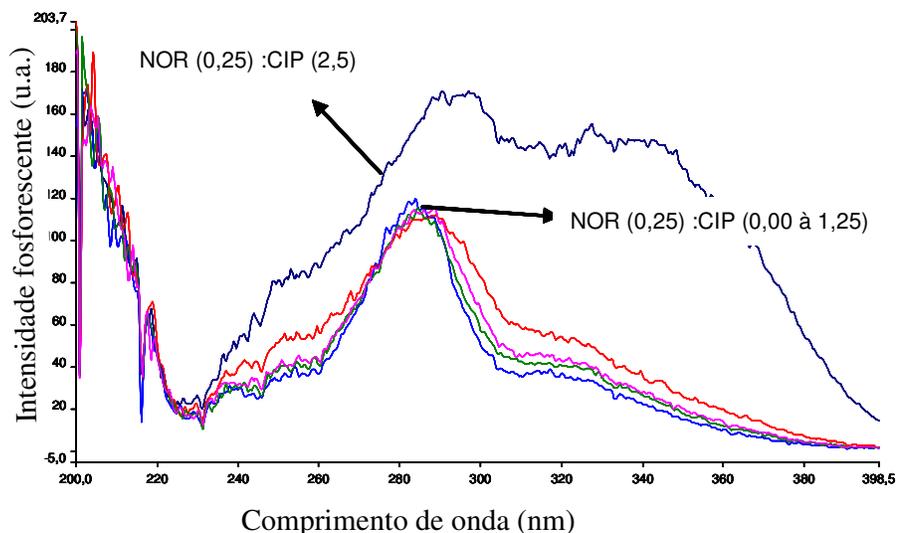


Figura 5.19. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da CIP no sinal da NOR com $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$: $\Delta\lambda = 181 \text{ nm}$ e velocidade de varredura de 600 nm min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

5.5.2.

Estudos de interferência da LEV e avaliação da determinação seqüencial usando varredura sincronizada

Foi mostrado anteriormente que a LEV possui espectros fosforescentes relativamente intensos tanto na presença de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ (295/551 nm) quanto na presença de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ (300/531 nm). Embora os pares $\lambda_{\text{exc}}\lambda_{\text{em}}$ sejam razoavelmente diferentes dos da NOR (284/440 nm para acetato de cádmio e 283/469 nm para nitrato de tório) a largura das bandas de emissão em termos de FWHM (em torno de 100 nm) provocaria sobreposição parcial de bandas e conseqüentemente interferência espectral quando da utilização de varredura espectral normal (varredura independente das bandas de excitação e de emissão). Já o uso de varredura espectral sincronizada pode viabilizar a determinação de ambas as FQs por causa dos significativamente diferentes valores de $\Delta\lambda$ para as duas substâncias (Tabela 5.8) e pela possível redução do FWHM da banda sincronizada em relação ao da banda de emissão da varredura normal. Por exemplo, o FWHM da banda de emissão da NOR na presença de nitrato de tório é aproximadamente 100 nm enquanto o valor obtido para o espectro na varredura sincronizada é de aproximadamente 30 nm. Assim, dois testes foram realizados, o primeiro para averiguar o potencial interferente da LEV no espectro sincronizado da NOR e o segundo para se avaliar o potencial interferente da NOR no espectro sincronizado da LEV. Para tal, a fosforescência de misturas contendo 0,25 nmol da FQ-analito e massas crescentes de FQ-interferente foram medidas nas condições envolvendo os dois sais de átomo pesado. Os resultados foram comparados com padrões dos analitos e avaliados em termos das razões $I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{LEV}})$ e $I_{\text{LEV}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{LEV}})$.

Tabela 5.8. Valores de $\Delta\lambda$ selecionado no modo de varredura sincronizada para NOR e para LEV.

Florquinolona	$\Delta\lambda$ (nm)	
	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$
NOR	157 nm	186 nm
LEV	220 nm	231 nm

No caso da presença de $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, só não foi verificada interferência espectral para misturas equimolares de NOR e de LEV. A redução da banda espectral de passagem (s') do instrumento de 10 para 6 nm foi feita com o intuito de tentar minimizar a interferência. Esse tipo de ajuste instrumental pode

melhorar a resolução espectral por causa do efeito direto na FWHM das bandas. Em contrapartida, pela redução de s , a intensidade do sinal luminescente medido é significativamente diminuído (em torno de seis vezes nesse experimento). No entanto, mesmo tentando ajustar s , as interferências espectrais persistiram semelhantemente ao verificado com $s=10$ nm. A Tabela 5.9 e Figura 5.20 mostram esse resultado.

Tabela 5.9. Estudo de interferência^a da LEV no sinal fosforescente da NOR usando $\text{Cd}(\text{OAc})_2$.

Proporção NOR ^b :LEV	Fosforescência (u.a.)	$I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{LEV}})$
1:0	$39,7 \pm 4,8$	1,0
1:1	$41,2 \pm 1,4$	0,95
1:2	$57,5 \pm 5,6$	0,69
1:5	$67,0 \pm 5,4$	0,59
1:10	$95,7 \pm 0,7$	0,41

^aQuantidade de NOR depositada no substrato: 0,25 nmol.

^bBanda espectral de passagem de 6 nm.

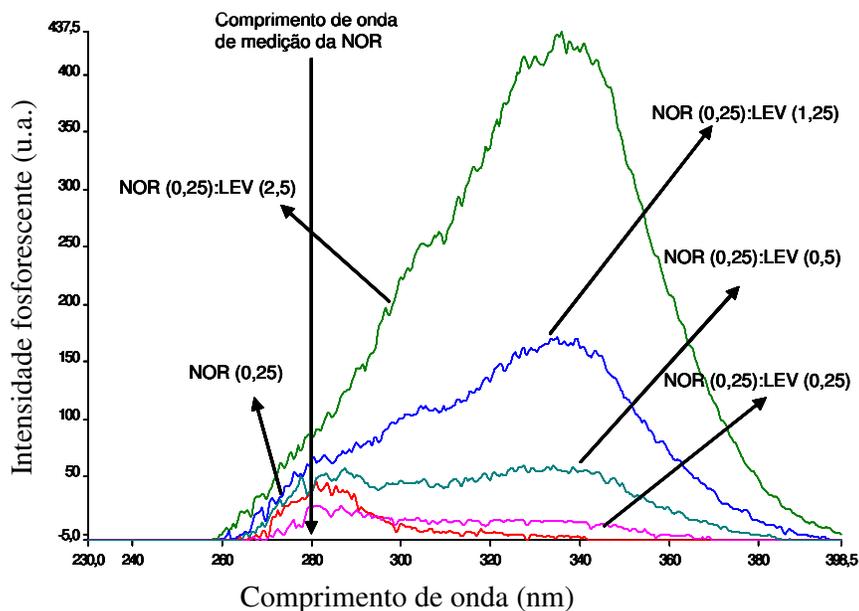


Figura 5.20. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da LEV no sinal da NOR com $\text{Cd}(\text{OAc})_2$: $\Delta\lambda = 157$ nm e velocidade de varredura de 600 nm min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

Para $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, o resultado é bem mais promissor, pois as interferências espectrais não são observadas no comprimento de onda de medição de sinal da NOR com misturas contendo até cinco vezes mais quantidade de LEV, como pode ser visto na Tabela 5.10 e na Figura 5.21. As bandas sincronizadas de NOR e de LEV são mostradas na Figura 5.22.

Tabela 5.10. Estudo de interferência^a da LEV no sinal fosforescente da NOR usando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$.

Proporção NOR ^b :LEV	Fosforescência (u.a)	$I_{\text{NOR}} / (I_{\text{NOR}} + I_{\text{LEV}})$
1:0	$251,2 \pm 25,2$	1,0
1:1	$247,4 \pm 38,3$	1,02
1:2	$241,9 \pm 9,8$	1,04
1:5	$246,7 \pm 1,0$	1,02
1:10	$444,3 \pm 0,8$	0,57

^aQuantidade de NOR depositada no substrato: 0,25 nmol.

^bBanda espectral de passagem de 10 nm.

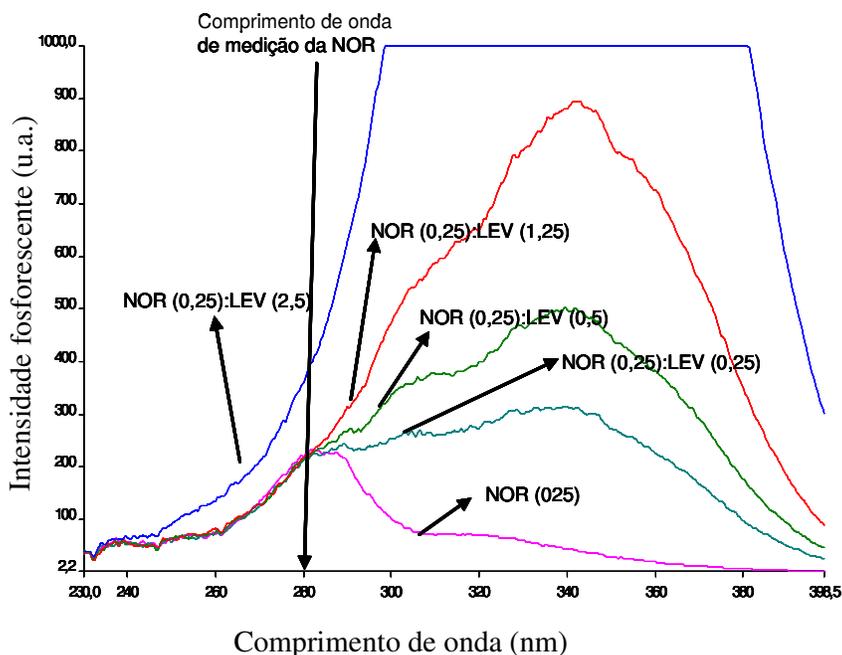


Figura 5.21. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da LEV no sinal da NOR com $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$: $\Delta\lambda = 186$ nm e velocidade de varredura de 600 nm min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

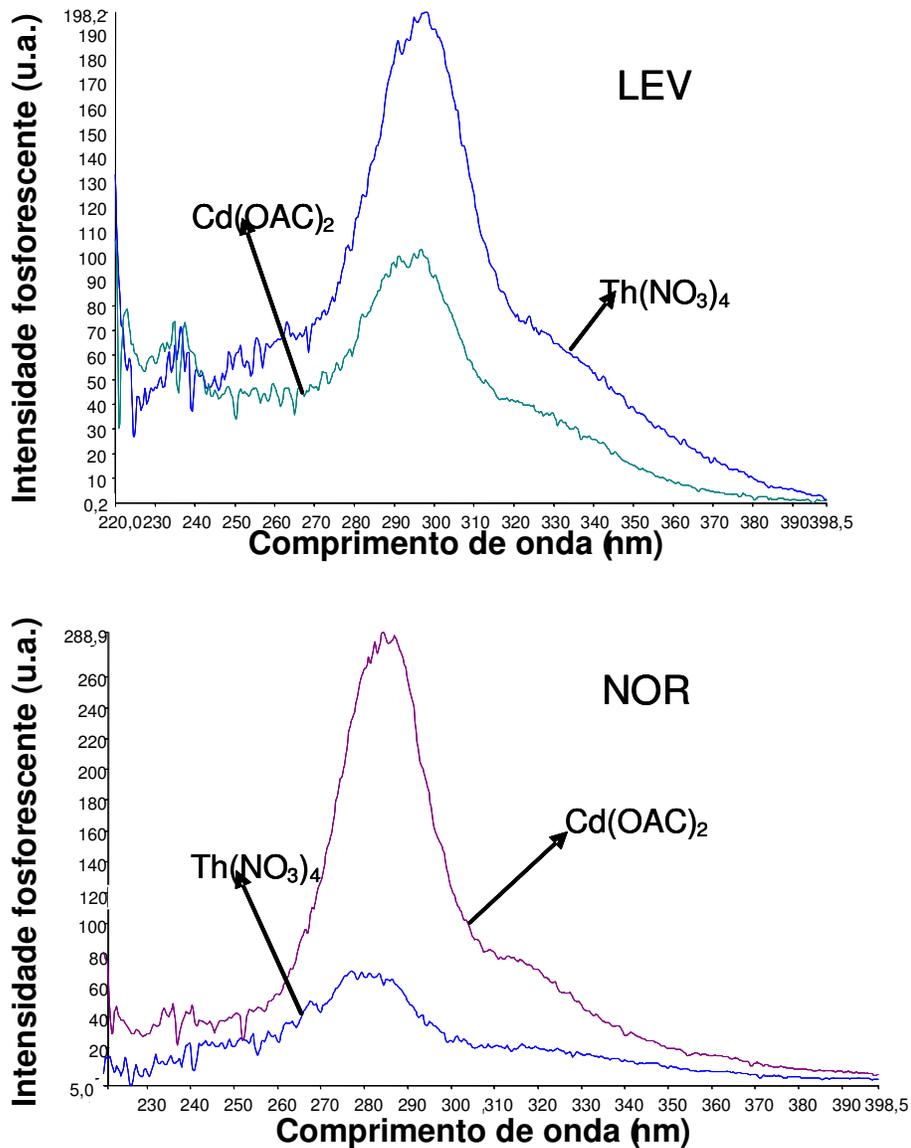


Figura 5.22. Espectros sincronizados de LEV e de NOR em substrato de celulose.

Ao se usar a mesma avaliação sistemática para a LEV, se vê que a NOR interfere mais efetivamente (até mesmo na proporção equimolar) no espectro sincronizado da LEV quando o $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ é utilizado com indutor de fosforescência (Tabela 5.11), enquanto que com o $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, a medição de LEV sem interferência pode ser feita em misturas contendo até cinco vezes maiores

quantidades de NOR (Figuras 5.23 e 5.24). Esse resultado mostra que a determinação seqüencial de NOR e de LEV pode ser feita efetivamente somente quando se utiliza o nitrato de tório como indutor de fosforescência, podendo ser feita em misturas contendo uma diferença de quantidades entre LEV e NOR de até cinco vezes.

Tabela 5.11. Estudo de interferência^a da NOR no sinal fosforescente da LEV usando Th(NO₃)₄.

Sal de átomo pesado	Proporção LEV:NOR ^b	Fosforescência (u.a)	$I_{LEV} / (I_{LEV} + I_{NOR})$
Cd(OAc) ₂	1:0	304,3 ± 6,0	1,00
	1:1	375,7 ± 7,8	0,81
	1:2	631,5 ± 6,3	0,48
	1:5	560 ± 10,3	0,54
	1:10	589,8 ± 9,9	0,52
Th(NO ₃) ₄	1:0	108,1 ± 1,6	1,00
	1:1	99 ± 12,0	1,09
	1:2	118 ± 8,0	0,92
	1:5	105 ± 8,0	1,02
	1:10	151,8 ± 13,2	0,71

^aQuantidade de LEV depositada no substrato: 0,25 nmol.

^bBanda espectral de passagem de 10 nm.

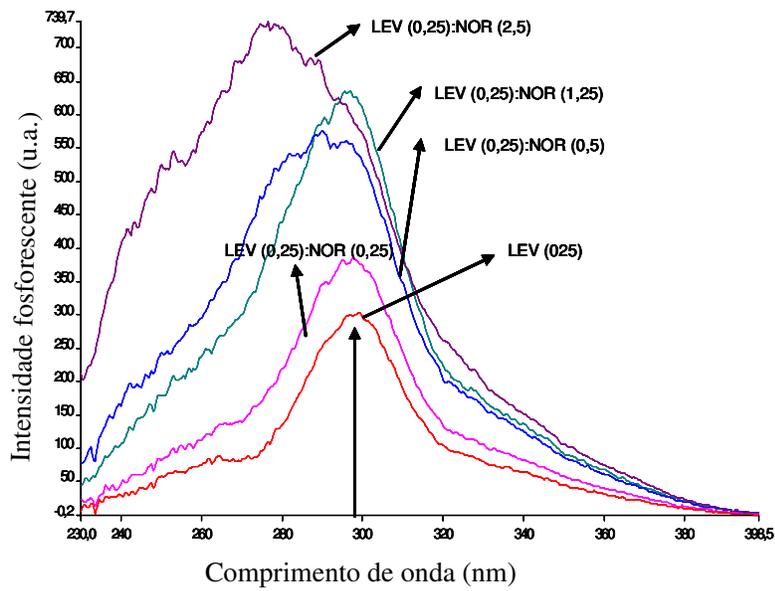


Figura 5.23. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da NOR no sinal da LEV com $\text{Cd}(\text{OAc})_2$: $\Delta\lambda = 220 \text{ nm}$ e velocidade de varredura de 600 min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol .

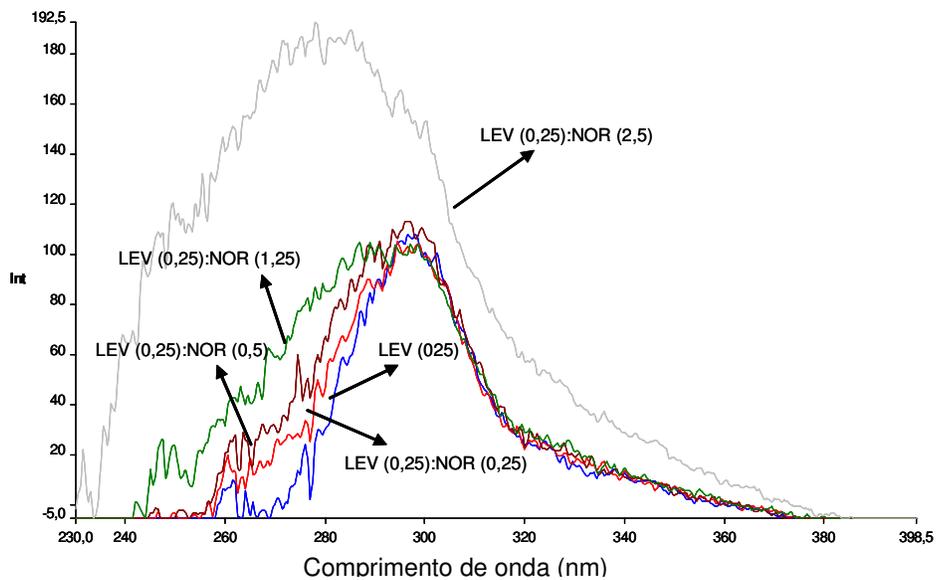


Figura 5.24. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da NOR no sinal da LEV com $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$: $\Delta\lambda = 231 \text{ nm}$ e velocidade de varredura de 600 min^{-1} . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol .

5.5.3. Estudos de interferência da MOX e da GAT

Com relação à presença de MOX e de GAT, resultados semelhantes em termos de seletividade foram observados para a NOR induzida por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ e por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$. Em ambos os casos, nenhuma interferência no sinal da NOR foi observada em substratos contendo até duas vezes mais quantidades de MOX e de GAT em decorrência da ausência de fosforescência dos interferentes nas condições escolhidas para a NOR. Para misturas contendo 5 e 10 vezes maiores quantidades de GAT ou MOX, interferência não-espectral foi observada com redução de aproximadamente 10 e 40% do sinal original. No entanto esse tipo de interferência não inviabiliza a determinação da NOR se procedimento de adição padrão for aplicado para corrigir esse tipo de efeito.

5.5.4 Estudos em urina

Com o intuito de testar o potencial do método em um fluido biológico, a urina foi selecionada, pois é uma via importante na eliminação das FQs. Na urina, esses agentes antimicrobianos são eliminados parcialmente na sua forma original, sendo que no caso da NOR, mais de 35% da quantidade ingerida é eliminada sem sofrer qualquer modificação metabólica. Entre os metabólitos mais importantes se encontram aquelas modificações com formação de grupos formil, oxo e desmetil, além de derivados do ácido glucorônico.²⁸

Para avaliar o efeito da matriz urina no sinal fosforescente da NOR, a condição experimental baseada no uso do $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ foi selecionada. Nesse caso, na composição da amostra, o tampão foi adicionado de forma a ajustar o pH do meio para 12. Assim, em soluções testadas com maior quantidade de urina, a composição percentual em volume foi igual a 45% de urina, 30% de tampão e o complemento de água. Neste estudo, o sinal fosforescente da NOR na urina foi 3,5 vezes menor que o sinal de solução padrão de referência. O pré-tratamento de limpeza da urina com sulfato de amônio, não implicou em melhoria desse resultado. Assim maiores diluições da matriz foram testadas, como mostrado na Tabela 5.12 e na Figura 5.25. Pôde se constatar que a minimização da interferência não-espectral provocada pela matriz biológica foi conseguida somente com o uso de 10% de urina em volume. Dependendo da sensibilidade do método analítico empregado esse fator de diluição não implicaria na inviabilização da determinação de NOR em amostras de urina. Mais

abaixo, os espectros de varredura sincronizada de misturas de NOR e LEV em urina, utilizando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ como sal indutor, são mostrados, indicando a não interferência dessa matriz quando diluída por um fator de 1 para 10, em volume (Figura 5.26 e Figura 5.27).

Tabela 5.12. Teste de interferência da matriz urina no sinal fosforescente da NOR.

% de urina na amostra ^{a,b}	Fosforescência	$I_{\text{NOR}}/ I_{\text{NOR em urina}}$
0% (padrão aquoso)	$188 \pm 4,0$	-
10%	$187,5 \pm 10,0$	1,00
25%	$66,7 \pm 5,6$	2,82
45%	$39,10 \pm 4,6$	4,81
45% com pré- tratamento ^d	$53,7 \pm 6,4$	3,5

^aTodas as amostras continham 30% de tampão Britton-Robinson em volume

^bQuantidade de NOR depositada no substrato: 0,25 nmol.

^cBanda espectra de passagem de 10 nm.

^dLimpeza da amostra com sulfato de amônio.

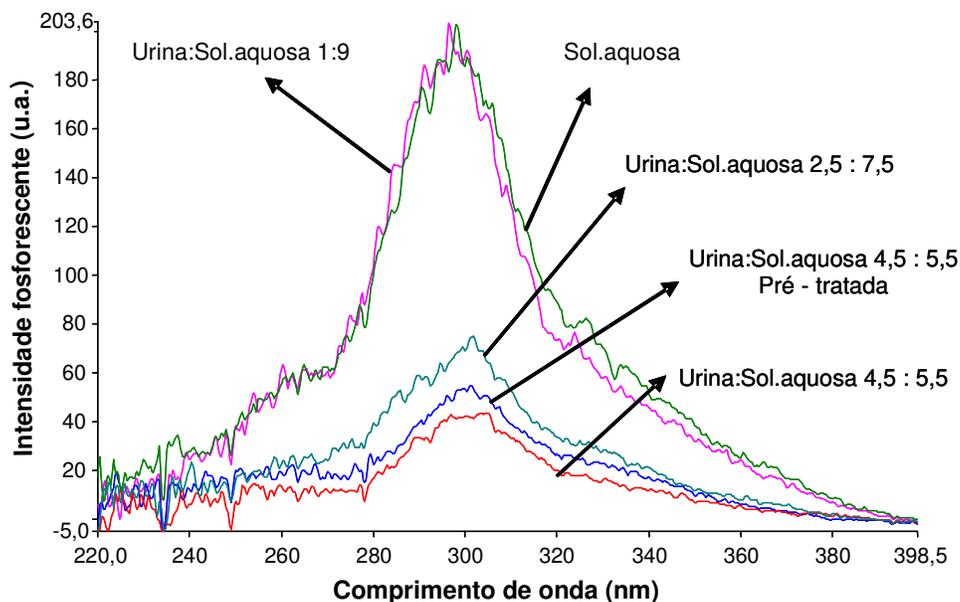


Figura 5.25. Estudos de interferência da urina na fosforescência de 80 ng de NOR utilizando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$: $\Delta\lambda = 181 \text{ nm}$ e velocidade de varredura de 600 nm min^{-1} .

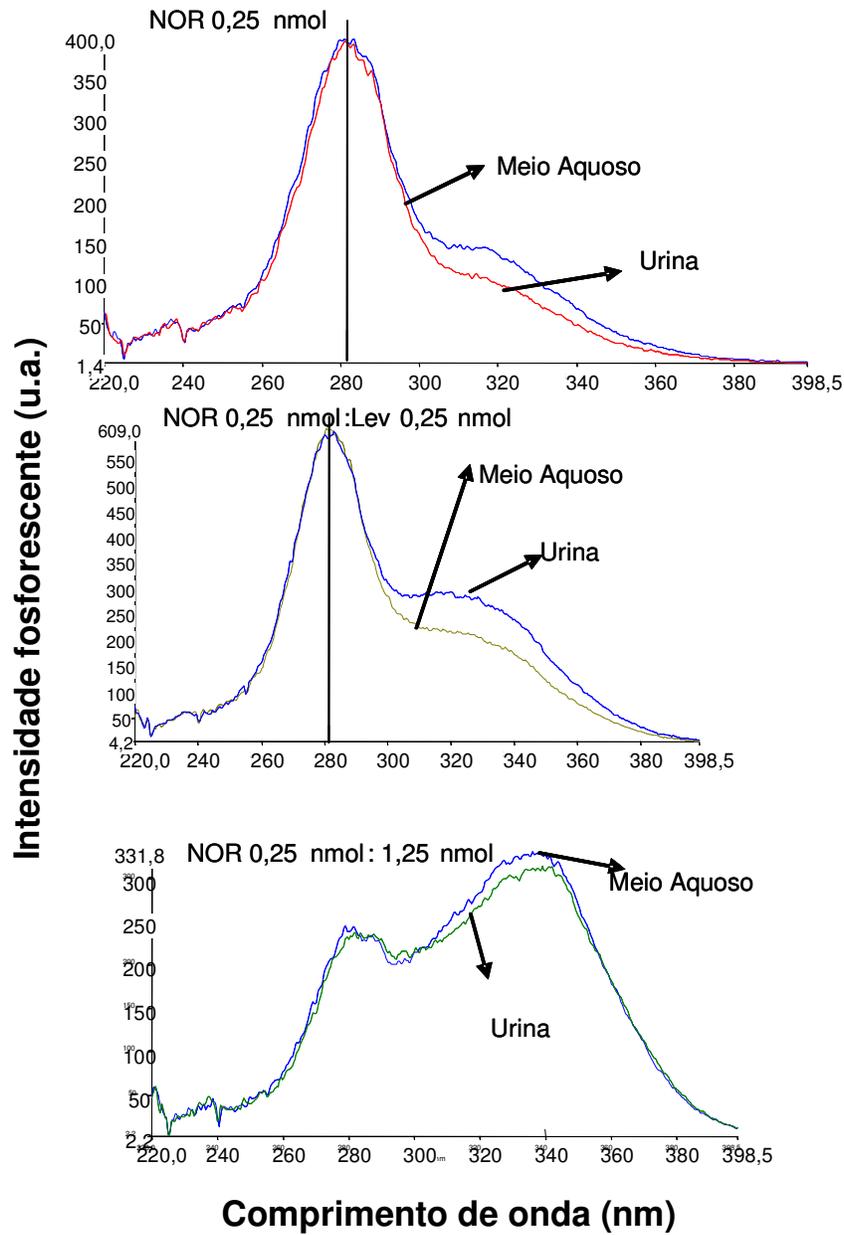


Figura 5.26. Comparação das medições do sinal da NOR por varredura sincronizada ($\Delta\lambda = 186$ nm) em urina e em meio aquoso usando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e quantidades crescentes de LEV como FQ-interferente.

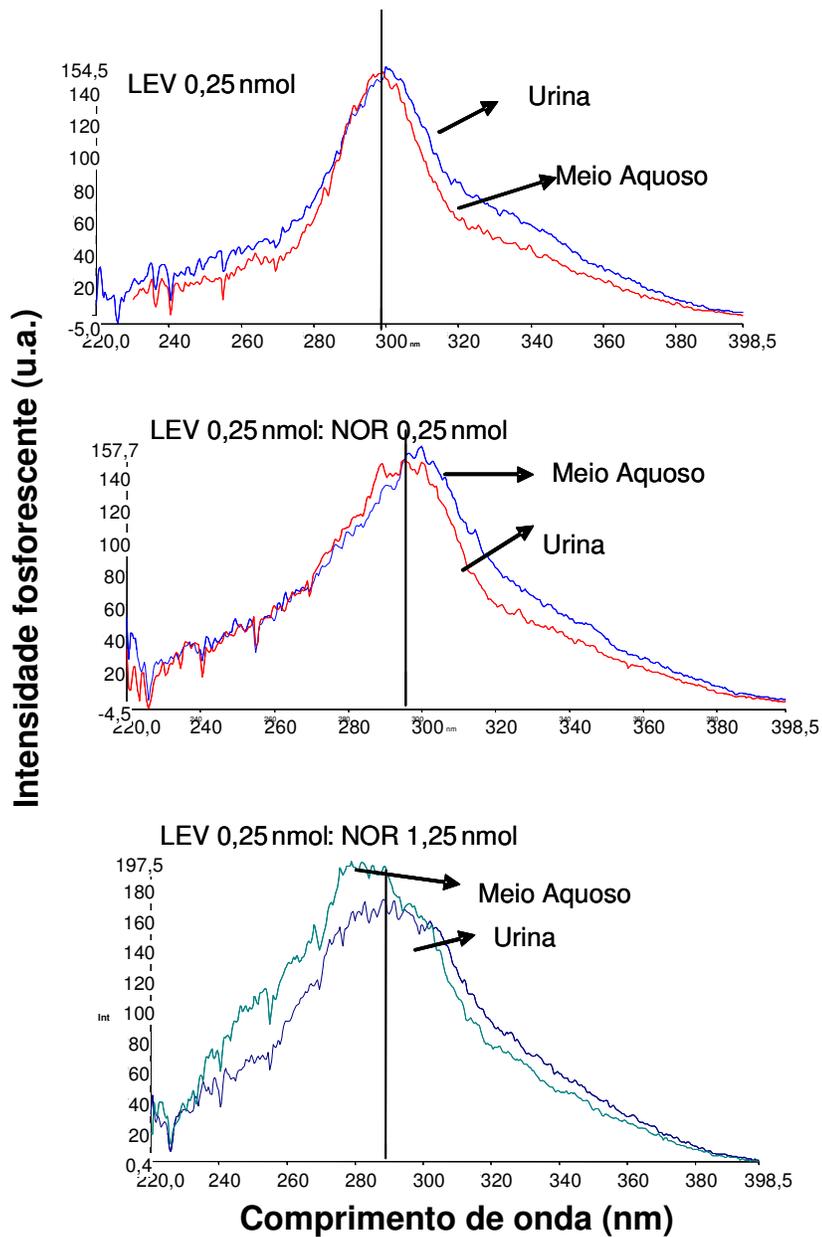


Figura 5.27. Comparação das medições do sinal da LEV por varredura sincronizada ($\Delta\lambda = 231 \text{ nm}$) eu urina e em meio aquoso usando $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e quantidades crescentes de NOR como FQ-interferente.

5.6 Desempenho dos métodos

O desempenho dos métodos analíticos fosforimétricos para determinação da NOR e para determinação de LEV de modo seqüencial, utilizando as condições escolhidas para a NOR, foi avaliado por meio da obtenção de alguns parâmetros de mérito e por meio de testes de recuperação em matriz aquosa e em urina diluída. Quatro situações foram avaliadas: (i) determinação de NOR usando nitrato de tório como sal indutor; (ii) determinação de NOR usando nitrato de cádmio como sal indutor; (iii) determinação de LEV usando nitrato de tório como sal indutor e (iv) determinação de LEV usando nitrato de cádmio como sal indutor. Os dois últimos casos são as avaliações de determinação seqüencial de NOR e de LEV que utilizam uma primeira varredura com o $\Delta\lambda$ característico da NOR e uma segunda varredura com o $\Delta\lambda$ característico da LEV. Os parâmetros de mérito de sensibilidade dos dois métodos para LEV foram comparados com os obtidos para um método fosforescente utilizando nitrato de tálio como sal indutor. A condição de fosforescência induzida por TINO_3 foi escolhida por ter sido indicada nos testes preliminares como condição mais sensível para determinação de LEV por SS RTP.

5.6.1. Curvas analíticas e linearidade

Curvas analíticas foram construídas com o depósito de 5 μL de soluções de concentrações crescentes de NOR ou de LEV (de 1×10^{-5} a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}). As respectivas faixas em massa são representadas nas figuras que representam essas curvas analíticas. No processo, três curvas foram obtidas para cada situação, sendo que cada uma delas foi construída em dias diferentes. Em todos os casos (Tabela 5.13), o comportamento linear foi obtido, como indicado pelos valores de coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,99. Os desvios padrões dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenadas está muito próxima do valor zero, indicando um erro sistemático mínimo (provavelmente causado pela não-homogeneidade dos substratos usados, mesmos estes sendo obtidos pelo tratamento de um mesmo lote de papéis-filtro). Já os desvios padrões dos coeficientes angulares representam a boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições. A Figura 5.28, Figura 5.29, Figura 5.30 e Figura 5.31 mostram

amostras das curvas obtidas para cada situação e os respectivos gráficos de resíduos que mostram comportamento homocedástico das variâncias.

A repetitividade das medições foi avaliada por meio de medições repetidas de padrões da NOR e da LEV depositados no substrato sólido em dois níveis de massa (Tabela 5.14).

Tabela 5.13. Parâmetros das curvas analíticas

Analito	Sal de átomo pesado	m	b	r^2
NOR	$\text{Cd}(\text{Oac})_2$	$0,88 \pm 0,02$	$16,9 \pm 9,6$	$0,9911 \pm 0,0040$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$0,74 \pm 0,04$	$49,3 \pm 19,3$	$0,9929 \pm 0,0040$
LEV	$\text{Cd}(\text{Oac})_2$	$1,64 \pm 0,16$	$7,5 \pm 5,1$	$0,9932 \pm 0,006$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$0,69 \pm 0,02$	$94,9 \pm 12,3$	$0,9947 \pm 0,021$

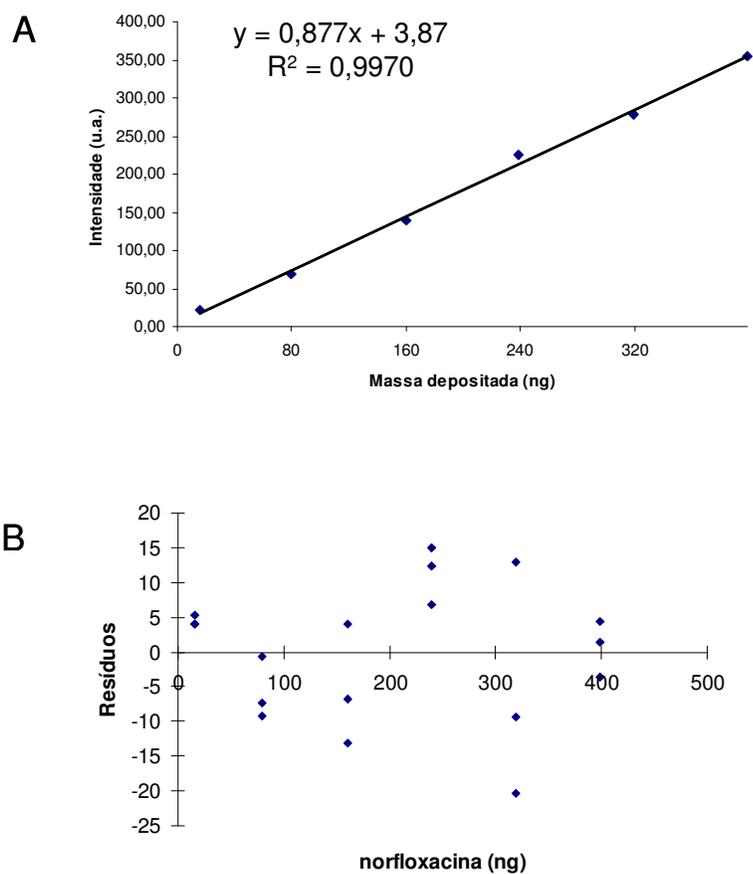


Figura 5.28. (A) Curva analítica da NOR - Fosforescência induzida por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ em função da massa de NOR depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

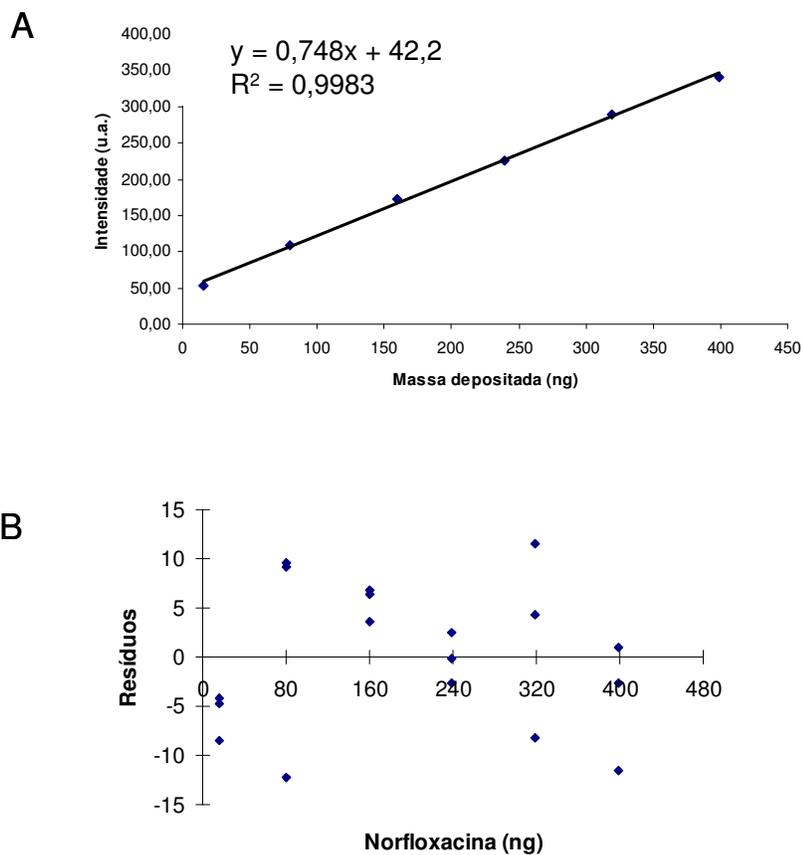


Figura 5.29. (A) Curva analítica da NOR - Fosforescência induzida por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ em função da massa de NOR depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

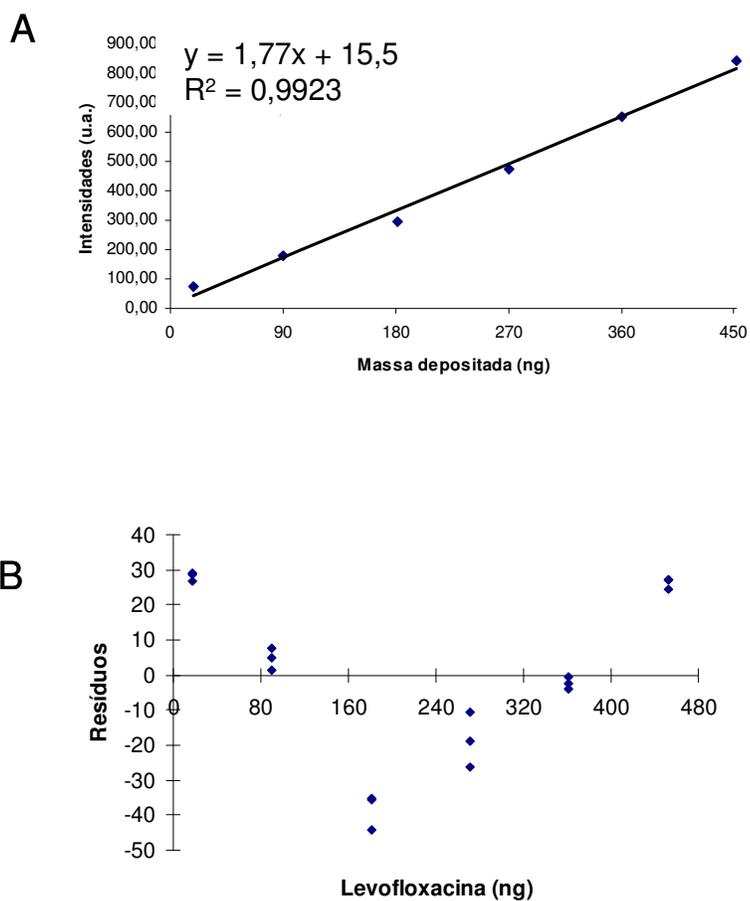


Figura 5.30. (A) Curva analítica da LEV - Fosforescência induzida por $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ em função da massa de LEV depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

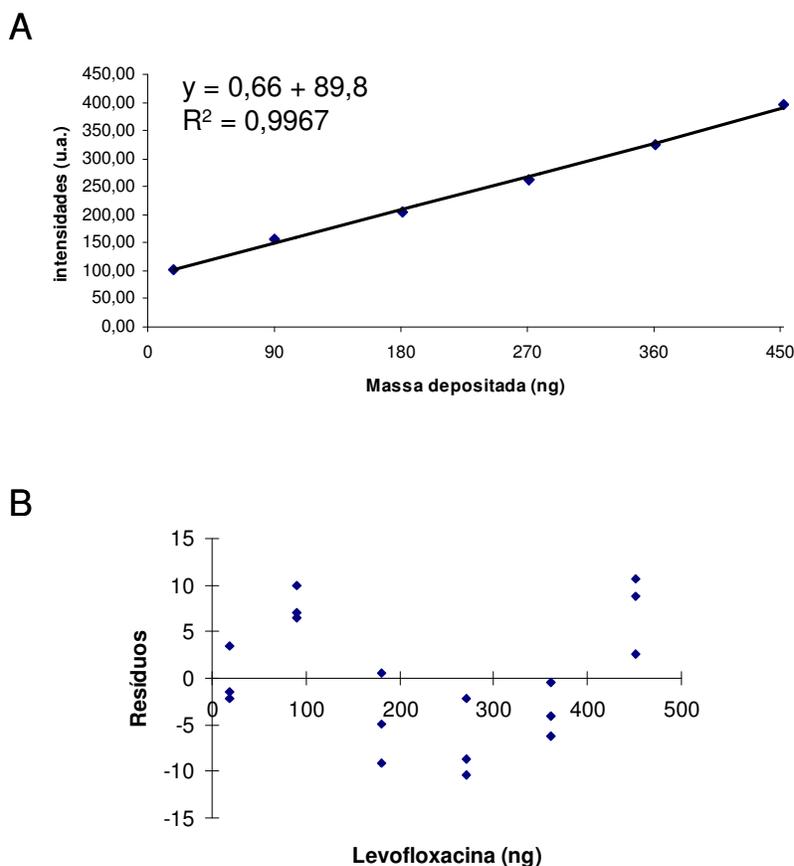


Figura 5.31. (A) Curva analítica da LEV - Fosforescência induzida por $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ em função da massa de LEV depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

Tabela 5.14. Estudos de precisão

Analito	Sal de átomo pesado	Precisão	
		com 80 ng	com 319 ng
NOR	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	9,9%	5,5%
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	12,9%	3,9%
		com 90 ng	com 361 ng
LEV	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	4,1%	0,9%
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	8,7%	2,4%

Uma curva analítica da fosforescência da LEV induzida por TINO_3 , com o seu respectivo gráfico de resíduos, também foi construída (Figura 5.31), visando a comparação de desempenho com o método de determinação de LEV seqüencialmente à determinação da NOR. Duas observações devem ser feitas quanto ao resultado experimental obtido nessa condição. Primeiro é a grande

variância do sinal de fundo, o que é característico dos métodos fosforescentes que fazem uso do átomo pesado tálio. O tálio tende a induzir fosforescência de componentes do papel-filtro. A segunda observação é sobre o coeficiente angular, que passa muito acima do zero (já considerando o desvio padrão desse coeficiente), indicando erro sistemático não completamente corrigido pelo branco.

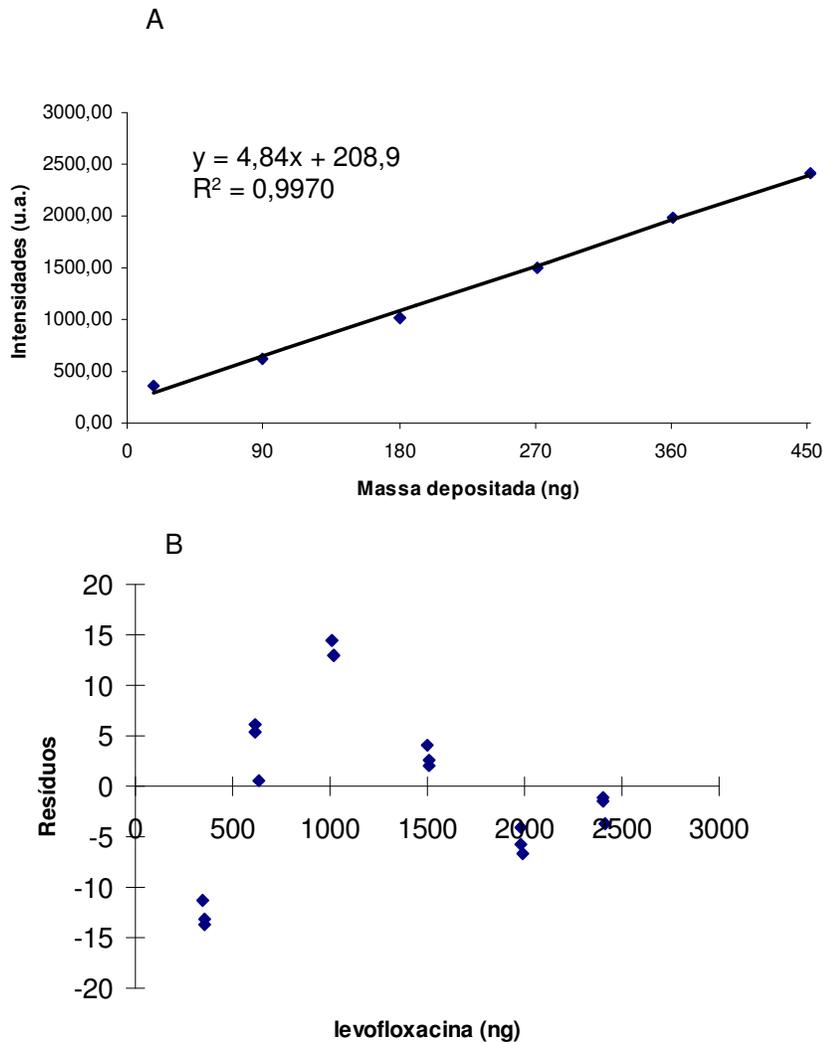


Figura 5.32. (A) Curva analítica da LEV - Fosforescência induzida por $TiNO_3$ em função da massa de LEV depositada no substrato de celulose (B) Gráfico de resíduos.

5.6.2. Parâmetros de sensibilidade

Os limites de detecção absolutos (LDA) assim como os limites de quantificação absolutos (LQA) foram calculados para cada situação (Tabela 5.15). No caso da LEV, o LQA e o LDA obtidos da curva construída com nitrato de tálio também são indicados para efeito de comparação. O cálculo desses limites utilizando valores absolutos é mais adequado por mostrar efetivamente a massa de analito detectável ou quantificável no substrato. Os critérios utilizados para o cálculo foram $3S_b/m$ (LDA) e $10S_b/m$ (LQA), onde S_b é o desvio padrão da medição de dez brancos e m é a inclinação (sensibilidade) da curva analítica em u.a. ng^{-1} . Os resultados mostrados são baseados nas três curvas analíticas obtidas para cada situação.

Os resultados mostraram que as massas quantificáveis (LQA) de LEV e de NOR são da ordem de ng, indicando a sensibilidade dos métodos propostos, mesmo para o modo de detecção seqüencial da LEV. Vale lembrar que essas condições de detecção seqüencial para a LEV não são as ótimas para esse composto e mesmo assim, os resultados encontrados podem ser comparáveis aos verificados para a condição de fosforescência induzida por TINO_3 (“condição ótima”). Esse resultado aquém do esperado para a “condição ótima” para a LEV pode ser explicado pelo maior desvio padrão do sinal do branco, quando comparados com os obtidos com $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ e $\text{Cd}(\text{OAc})_2$.

Tabela 5.15. Parâmetros de sensibilidade

Analito	Sal de átomo pesado	LDA (ng)	LQA (ng)
NOR	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$9,1 \pm 0,3$	$30,4 \pm 0,9$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$11,5 \pm 0,8$	$38,6 \pm 2,7$
LEV	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$4,9 \pm 0,5$	$16,1 \pm 1,9$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$12,5 \pm 0,4$	$41,3 \pm 1,8$
	TINO_3	$1,6 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,2$

5.6.3. Testes de recuperação (exatidão)

A aplicabilidade dos métodos foi avaliada por meio de testes de recuperação, onde o valor de quantidade de analito obtido experimentalmente (valor recuperado) é comparado com a quantidade depositada no substrato a partir de uma amostra cujo valor de analito é indicado. No caso das formulações farmacêuticas, o valor de referência é calculado a partir da indicação da bula dos medicamentos. Para amostras de urina, o valor de referência é a quantidade de padrão adicionado à amostra.

Três tipos de amostras foram testados, o primeiro tipo é referente a medicações farmacêuticas comercial contendo NOR ou LEV; o segundo tipo é referente a simulações de formulações farmacêuticas constituídas pela contaminação com NOR ou com LEV, nas formulações farmacêuticas contendo respectivamente LEV ou NOR. O mesmo foi feito com a contaminação da formulação de NOR com CIP. As quantidades da substância concomitante adicionada na formulação simulada foram: (i) quantidade equimolar e (ii) quantidade cinco vezes maior em mol. Finalmente, o terceiro tipo de amostra é a urina enriquecida com NOR ou com LEV ou urina enriquecida com misturas NOR/LEV ou NOR/CIP. As determinações de NOR na presença da CIP só foram usadas o $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ com sal indutor pois foi demonstrado que o $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ produziu interferência espectral. Para as determinações envolvendo misturas de NOR e LEV os dois sais indutores foram testados. Os resultados das recuperações são a média obtida em determinações realizadas em três dias diferentes e são mostrados na Tabela 5.16, Tabela 5.17 e Tabela 5.18.

Tabela 5.16. Recuperação nas determinações em amostras de formulações farmacêuticas contendo NOR ou LEV usando SSRTTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Sal de átomo pesado	Recuperação
NOR	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$94,6 \pm 1,1\%$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$94,4 \pm 3,3\%$
LEV	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$98,4 \pm 2,6\%$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$103,8 \pm 0,2\%$

Tabela 5.17. Recuperação nas determinações em amostras de formulações farmacêuticas simuladas contendo NOR ou LEV como princípio ativo usando SS RTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Interferente (proporção analito:interferente)	Sal de átomo pesado	Recuperação
NOR	CIP (1:1)	Th(NO ₃) ₄	101 ± 4,5%
NOR	CIP (1:5)	Th(NO ₃) ₄	99,5 ± 8,5%
NOR	CIP (1:1)	Cd(OAc) ₂	246,4 ± 91,8%
NOR	CIP (1:5)	Cd(OAc) ₂	399,1 ± 37,0%
NOR	LEV (1:1)	Th(NO ₃) ₄	100,0 ± 6,0%
NOR	LEV (1:5)	Th(NO ₃) ₄	91,6 ± 1,4%
NOR	LEV (1:1)	Cd(OAc) ₂	193,0 ± 28,0%
NOR	LEV (1:5)	Cd(OAc) ₂	538,0 ± 69,0%
LEV	NOR (1:1)	Th(NO ₃) ₄	100,4 ± 7,5%
LEV	NOR (1:5)	Th(NO ₃) ₄	95,9 ± 6,9%
LEV	NOR (1:1)	Cd(OAc) ₂	280,7 ± 6,7%
LEV	NOR (1:1)	Cd(OAc) ₂	342,2 ± 116,0%

Tabela 5.18. Recuperação nas determinações em urina enriquecida contendo NOR ou LEV como princípio ativo usando SS RTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Interferente (proporção analito:interferente)	Sal de átomo pesado	Recuperação
NOR	-	Th(NO ₃) ₄	101,2 ± 3%
NOR	-	Cd(OAc) ₂	91,7 ± 1,3%
LEV	-	Th(NO ₃) ₄	103,1 ± 4,3%
LEV	-	Cd(OAc) ₂	97,4 ± 4,1%
NOR	CIP (1:1)	Th(NO ₃) ₄	95,3 ± 6,1%
NOR	CIP (1:5)	Th(NO ₃) ₄	97,2 ± 10,9%
NOR	CIP (1:1)	Cd(OAc) ₂	212,2 ± 73,4%
NOR	CIP (1:5)	Cd(OAc) ₂	389,2 ± 58,8%
NOR	LEV (1:1)	Th(NO ₃) ₄	92,4 ± 1,3%
NOR	LEV (1:5)	Th(NO ₃) ₄	91,9 ± 0,9%
NOR	LEV (1:1)	Cd(OAc) ₂	177,3 ± 17,3%
NOR	LEV (1:5)	Cd(OAc) ₂	484 ± 99,0%
LEV	NOR (1:1)	Th(NO ₃) ₄	105,3 ± 3,6%
LEV	NOR (1:5)	Th(NO ₃) ₄	98,8 ± 6,8%
LEV	NOR (1:1)	Cd(OAc) ₂	250,6 ± 26,5%
LEV	NOR (1:1)	Cd(OAc) ₂	314,6 ± 34,5%

Os resultados dentro da faixa de recuperação indicada pela U.S.P. (90 a 110%) mostram claramente que os métodos para a determinação de NOR, utilizando ambos os sais indutores de fosforescência são adequados, não importando a presença de componentes da matriz real ou simulada. Para LEV, ficou claramente confirmado que o nitrato de tório permitiu sua determinação enquanto que o uso de acetato de cádmio promoveu recuperações muito acima do esperado para amostras simuladas contendo NOR. Logo, o método SSRTTP baseado no uso de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ pode ser utilizado para a determinação de ambos as FQs (NOR e LEV) utilizando o mesmo substrato desde que as proporções entre eles não passem de cinco para um.