

## 6 Método para a determinação seletiva de CIP na presença de GAT ou MOX

### 6.1 Comentário preliminar

Nesse segundo estudo de caso, decidiu-se desenvolver um método fosforimétrico seletivo para a determinação de CIP em amostras contendo GAT e MOX. Para este estudo, os dois sais de átomos pesados, acetato de cádmio e nitrato de tório, foram novamente escolhidos. Esses sais de átomos pesados foram escolhidos em virtude do desempenho relativo da fosforescência da CIP em relação às FQs concomitantes, evitando-se principalmente condições em que a quantidade molar equivalente de GAT e MOX não suprimissem o sinal fosforescente da CIP, o que impossibilitaria sua determinação seletiva.

O sistema de solventes usado neste caso foi o mesmo utilizado para a NOR, pois, os efeitos da polaridade (abertura dos poros) e da formação de empacotamento cristalino (por causa da massa cristalina proveniente do tampão no substrato seco) são função da interação entre o sistema de solvente e a superfície do substrato de papel. Desde que a resposta em função desse parâmetro já foi avaliada no caso da NOR, espera-se que resposta similar ocorra para as outras FQs.

O pH da solução carreadora foi escolhido em função de cada sal de átomo pesado, para a deposição de solução em substratos contendo  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , o pH 10 foi o escolhido, já para a deposição de soluções em substratos contendo  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  o pH 6 foi o escolhido. Essa escolha se baseou na região de maior fosforescência observada para a CIP nas duas situações (vide Figura 4.4 e Figura 4.5). Com base nessas escolhas, foi realizado um estudo univariado no sentido de encontrar a melhor faixa de trabalho para a realização dos estudos multivariados que culminaram na escolha das condições experimentais finais da CIP. Nessas condições, os principais parâmetros de desempenho para a CIP foram obtidos e uma avaliação da seletividade para a determinação da CIP em amostras com diferentes quantidades de GAT e de MOX foi realizada. Em seguida, os ajustes instrumentais e estratégias de varredura foram escolhidos.

Por fim testes de recuperação em amostras medicamentosas e em urina foram realizados.

## **6.2**

### **Estudos univariados para a CIP**

Nesta fase, novamente o efeito da quantidade de sal de átomo pesado e da quantidade de SDS depositado no substrato de papel foram estudados univariadamente.

#### **6.2.1.**

##### **Efeito da massa de sal de átomo pesado no substrato**

Conforme dito anteriormente, o efeito externo do sal de átomo pesado foi fundamental na indução de fosforescência da CIP, sendo mais eficazes os sais  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ . Para ajustar a massa ideal de sal no substrato, 5  $\mu\text{L}$  de soluções de CIP ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) preparadas em pH adequado foram depositadas em substratos de celulose, nos quais foram previamente aplicados 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de solução de sal foi utilizada. Seguindo a mesma linha de raciocínio do capítulo anterior, nesta etapa, não foram testadas adições múltiplas ( $n \times 5\mu\text{L}$ ) de solução de sal de átomo pesado.

Na Figura 6.1 e na Figura 6.2 pode se observar a influência da concentração destes sais de átomo pesados na intensidade do sinal fosforescente da CIP. De acordo com os resultados obtidos, sinais fosforescentes de CIP mais intensos foram observados na presença de 600  $\mu\text{g}$  de nitrato de tório. No caso do acetato de cádmio, a tendência da curva é de estabilidade de intensidade de sinal da CIP a partir de 333  $\mu\text{g}$  de sal.

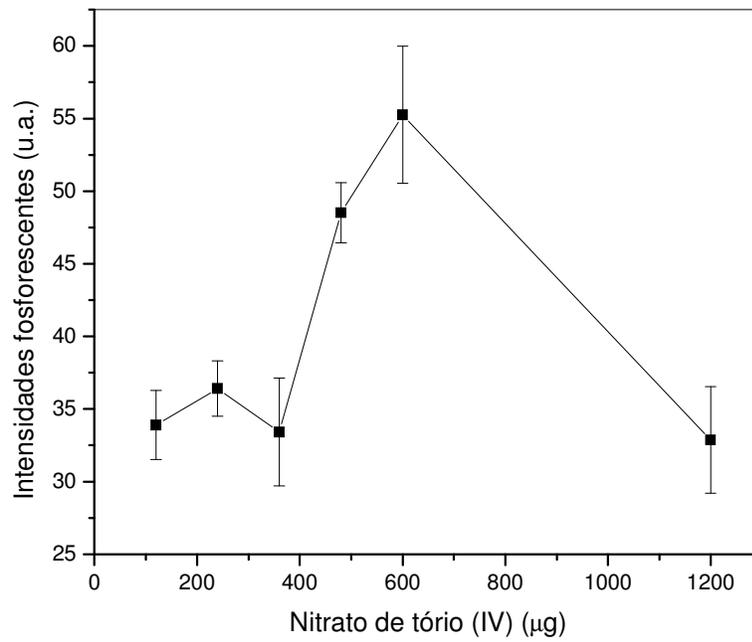


Figura 6.1. Estudo do efeito da massa de  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  presente no substrato no sinal fosforescente da CIP. Solução carreadora de analito em seu pH 6.

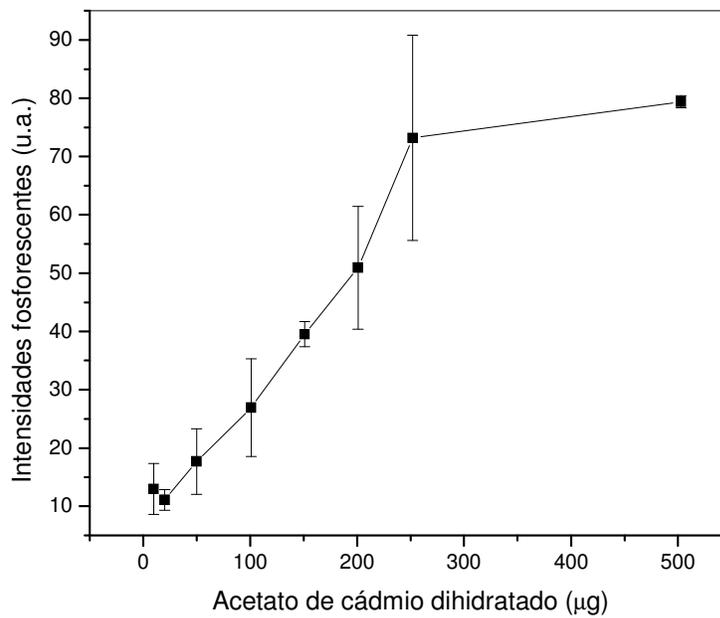


Figura 6.2. Estudo do efeito da massa de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  presente no substrato no sinal fosforescente da CIP. Solução carreadora de analito ajustada em pH 10.

## 6.2.2

### Efeito da massa de SDS usada como modificador de superfície

No estudo do efeito do SDS no sinal fosforescente da CIP induzido por  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  e por  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , substratos contendo diferentes quantidades de SDS foram testados. Apenas uma adição de 5  $\mu\text{L}$  foi usada, implicando na limitação da massa mais elevada de SDS presente no substrato em 360  $\mu\text{g}$ . A Figura 6.3 e a Figura 6.4 mostram as variações de sinal da CIP obtidas com diferentes massas de SDS em substratos contendo sal de tório e cádmio, respectivamente.

Os resultados mostraram que a quantidade de SDS no substrato afeta o sinal da CIP para os dois sais de átomos pesados utilizados. Dentro das faixas estudadas, 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 duas vezes e meio maior com 360  $\mu\text{g}$  de SDS quando comparado com a situação na ausência do surfactante, porém a curva mostra uma tendência de subida que será verificada no estudo multivariado. 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 CIP induzido por  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  a amplificação foi em torno de duas vezes maior com 216  $\mu\text{g}$  de SDS.

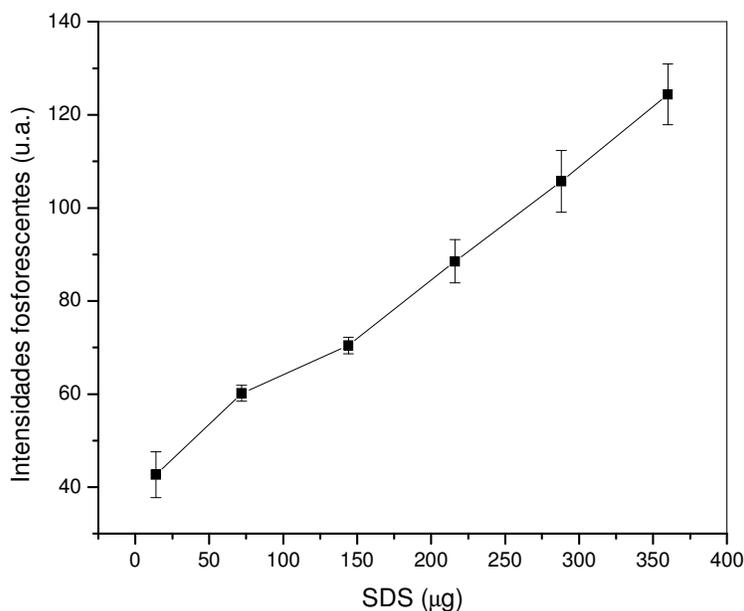


Figura 6.3. Estudo do efeito da massa de SDS presente no substrato no sinal fosforescente da CIP induzida por  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ . Solução carreadora de analito em pH 5,8 (natural da própria solução) e substrato contendo 600  $\mu\text{g}$  de sal.

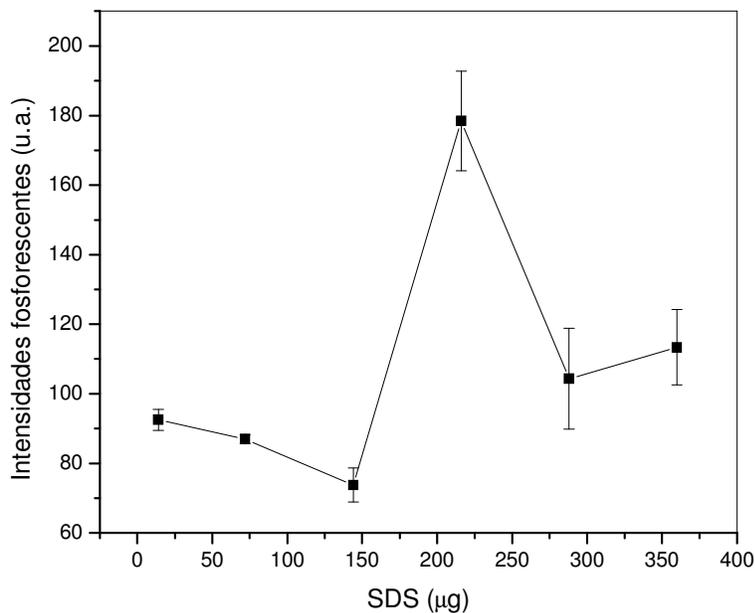


Figura 6.4. Estudo do efeito da massa de SDS presente no substrato no sinal fosforescente da CIP induzida por  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ . Solução carreadora de analito ajustada em pH 10 e substrato contendo 666 µg de sal.

### 6.3 Estudos multivariados para a CIP

Estudos multivariados foram realizados utilizando faixas de trabalho escolhidas com base no estudo univariado. No caso da quantidade de SDS na presença de  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ , a dupla adição de solução de maior molaridade foi testada por causa da tendência de subida de fosforescência da CIP no limite das massas referente a uma única adição das respectivas soluções. Para a massa depositada de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , foram testadas a dupla adição (1332 µg) e tripla adição (1998 µg) devido a leve tendência de subida de fosforescência da CIP com esse sal. Os níveis escolhidos para cada parâmetro são mostrados na Tabela 6.1. Os resultados dos 16 experimentos na presença de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  realizados em ordem aleatória e em duplicatas autênticas são mostrados na Tabela 6.2.

A representação gráfica desses resultados pode ser observada na forma de gráfico de Pareto (Figura 6.5) onde se pode concluir que não existem diferenças se o pH da solução carreadora for ajustado entre 10 e 11, e as massas depositadas de SDS estiverem entre 216 e 288 µg. Com relação à quantidade de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  podemos concluir que não existem diferenças se a

Tabela 6.1 Fatores e níveis escolhidos para o estudo univariados do efeito na fosforescência da CIP.

Cd(OAc) <sub>2</sub>		Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	
$\lambda_{exc}\backslash\lambda_{em} = 282\backslash452 \text{ nm}$		$\lambda_{exc}\backslash\lambda_{em} = 288\backslash447 \text{ nm}$	
Nível		Nível	
Parâmetro	mínimo(-)–máximo(+) “Faixa de trabalho”	Parâmetro	mínimo(-)–máximo(+) “Faixa de trabalho”
(1) pH	11(-) – 10(+)	(1) pH	5(-) – 5,8(+)
(2) Massa Cd(OAc) <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}$ )	1332(-) – 1998(+)	(2) Massa de sal Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}$ )	480(-) – 600(+)
(3) Massa de SDS ( $\mu\text{g}$ )	216(-) – 288(+)	(3) Massa de SDS ( $\mu\text{g}$ )	360(-) – 720(+)

Tabela 6.2 Tabela de resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> usando Cd(OAc)<sub>2</sub> como sal indutor de fosforescência da NOR.

Ordem	Experimento	replicata	SDS ( $\mu\text{g}$ )	Cd(OAc) <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}$ )	pH	Resultado <sup>a</sup> (ua)
1	16	2	288	1332	11	130
2	12	2	288	1332	10	232
3	3	1	216	1332	10	164
4	10	2	288	1998	10	122
5	11	2	216	1332	10	156
6	9	2	216	1998	10	150
7	5	1	216	1332	11	179
8	15	2	216	1998	11	215
9	1	1	216	1998	10	156
10	8	1	288	1998	11	165
11	4	1	288	1332	10	123
12	7	1	216	1998	11	167
13	2	1	288	1332	10	195
14	14	2	288	1998	11	143
15	13	2	216	1998	11	123
16	6	1	288	1332	11	124

<sup>a</sup> Fosforescência da NOR em unidades arbitrárias (u.a.)

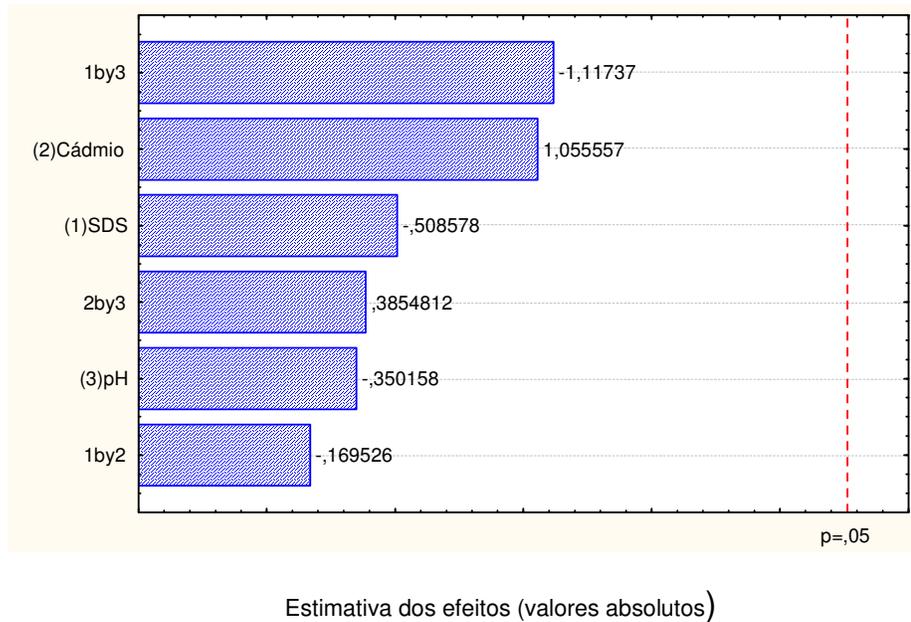


Figura 6.5. Gráfico de Pareto gerado com base no sinal fosforescente da CIP na presença de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ . As barras marcadas 1 by 3; 2 by 3; 1 by 2 indicam as interações entre os fatores, sendo 1 (SDS); 2 (sal de átomo pesado) e 3 (pH).

massa depositada for de 1332 e 1998  $\mu\text{g}$ , portanto o modelo usado é robusto e não precisa de refinamento.

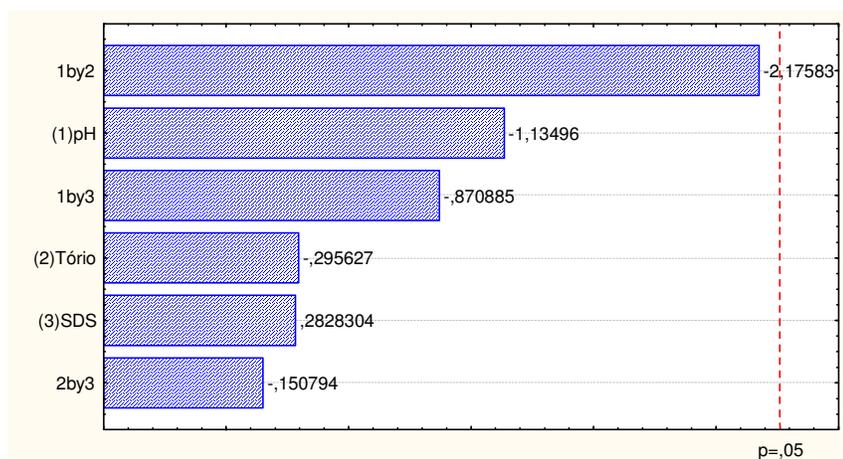
Seguindo a mesma linha de raciocínio usado na otimização do sinal da CIP com o uso do  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , a otimização com o  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  também foi realizada. Na Tabela 6.3 se encontram as condições escolhidas bem como os resultados dos 16 experimentos de medição de fosforescência da CIP. 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 deveria testada uma, para efeito explicativo, uma adição corresponde a 360  $\mu\text{g}$  e duas adições a 720  $\mu\text{g}$  (Tabela 6.1).

Tabela 6.3 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 CIP.

Ordem	Experimento	replicata	SDS ( $\mu\text{g}$ )	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ ( $\mu\text{g}$ )	pH	Resultado <sup>a</sup> (ua)
1	2	1	360	480	5,8	117
2	9	2	360	480	5	110
3	12	2	360	600	5,8	130
4	5	1	720	480	5	139
5	15	2	720	600	5	150
6	16	2	720	600	5,8	114
7	8	1	720	600	5,8	100
8	11	2	360	600	5	120
9	14	2	720	480	5,8	112
10	6	1	720	480	5,8	150
11	3	1	360	600	5	149
12	13	2	720	480	5	117
13	1	1	360	480	5	127
14	10	2	360	480	5,8	150
15	7	1	720	600	5	139
16	4	1	360	600	5,8	100

<sup>a</sup> Fosforescência da CIP em unidades arbitrárias (u.a.)

O gráfico de Pareto resultante desse planejamento é mostrado na Figura 6.6. e indica a não relevância das interações entre fatores dentro das faixas estudadas, e a robustez para as faixas do pH, massa de tório e massa de SDS a serem utilizadas, na Tabela 6.4 estão resumidas as condições experimentais escolhidas para a determinação fosforimétrica de CIP para ambos os sais e seus respectivos espectros se encontram na Figuras 6.7 e na Figura 6.8.



Estimativa dos efeitos (valores absolutos)

Figura 6.6. Gráfico de Pareto gerado com base no sinal fosforescente da CIP 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 (pH); 2 (sal de átomo pesado) e 3 (SDS).

Tabela 6.4. Condições escolhidas para a determinação fosforimétrica de CIP.

Parâmetro	Sal de átomo pesado	
	$\lambda_{\text{exc}} \backslash \lambda_{\text{em}}$	
	Acetato de cádmio 282\452 nm	Nitrato de tório 288\525 nm
pH	10	5,8 (natural)
Massa de sal no substrato	1332 $\mu\text{g}$	600 $\mu\text{g}$
Massa de SDS no substrato	216 $\mu\text{g}$	360 $\mu\text{g}$

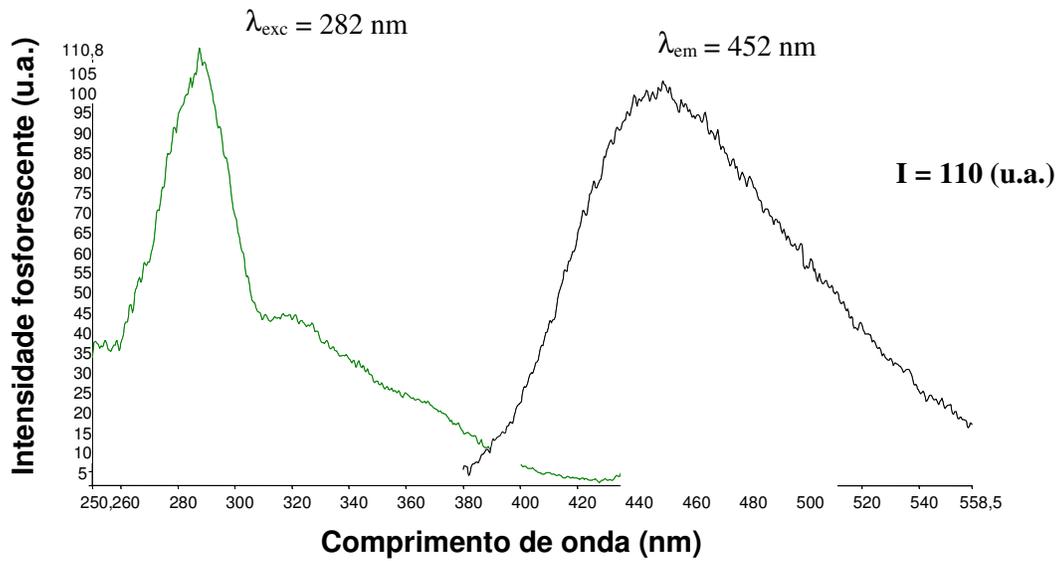


Figura 6.7. Espectro fosforescente de 80 ng de CIP em substrato de celulose contendo 666  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  e 216  $\mu\text{g}$  de SDS. Solução carreadora em pH 10.

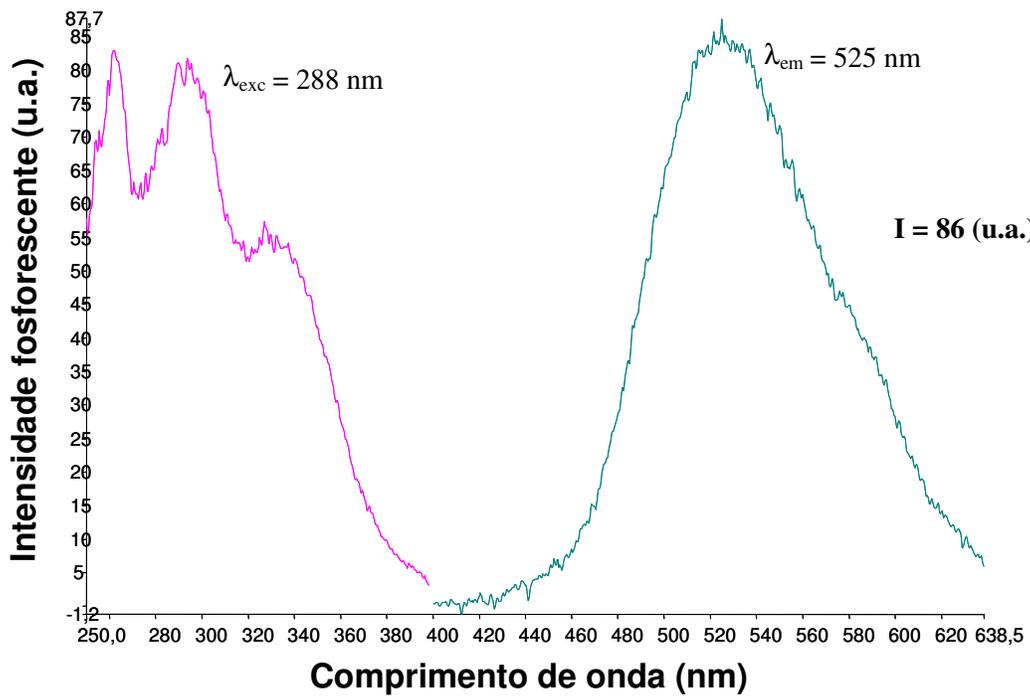


Figura 6.8. Espectro fosforescente de 80 ng de CIP em substrato de celulose contendo 600  $\mu\text{g}$  de  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  e 360  $\mu\text{g}$  de SDS. Solução carreadora em pH 5,8 (natural).

## 6.4 Estudo de interferência no sinal da CIP

Estudos para a avaliação do potencial interferente das FQs (MOX, GAT) e de componentes da matriz urina foram realizados com o intuito de se estabelecer estratégias para a determinação de CIP em formulações contendo essas outras duas 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 CIP foram comparados com os sinais fosforescentes obtidos de misturas contendo CIP e uma outra FQ presente em quantidades crescentes, até dez vezes mais concentradas em  $\text{mol L}^{-1}$  em solução ou em mol no substrato. Esses valores de sinal foram comparados na forma de razão  $I_{\text{CIP}} / (I_{\text{CIP}} + I_{\text{FQ}})$ , onde o índice FQ se referiu à presença da MOX ou da GAT. 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 foi dito no capítulo anterior (Capítulo 5).

### 6.4.1. Estudo da interferência da GAT

Nas condições escolhidas para a CIP utilizando  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , esperava-se que a GAT não apresentasse sinal fosforescente, como indicado nos estudos preliminares. No entanto, verificou-se forte interferência não-espectral da GAT nas bandas espectrais de excitação e de emissão da CIP (288/452 nm) como indicado na Tabela 6.5. Esta interferência foi significativa até mesmo nas misturas contendo quantidades equimolares de CIP e de GAT. Esse resultado pode ser observado nos espectros da Figura 6.9. onde os valores em parênteses indicam a quantidade de CIP ou GAT em nmol.

Tabela 6.5. Estudo de interferência<sup>a</sup> da GAT no sinal fosforescente da CIP usando  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ .

Proporção CIP <sup>b</sup> :GAT	Fosforescência (u.a.)	$I_{\text{CIP}} / (I_{\text{CIP}} + I_{\text{GAT}})$
1:0	$128,6 \pm 27,43$	1,0
1:1	$69,13 \pm 8,06$	1,86
1:2	$51,59 \pm 3,50$	2,49
1:5	$51,69 \pm 8,01$	2,49
1:10	$38,81 \pm 8,99$	3,31

<sup>a</sup>Quantidade de CIP depositada no substrato: 0,25 nmol.

<sup>b</sup>Banda espectral de passagem de 10 nm.

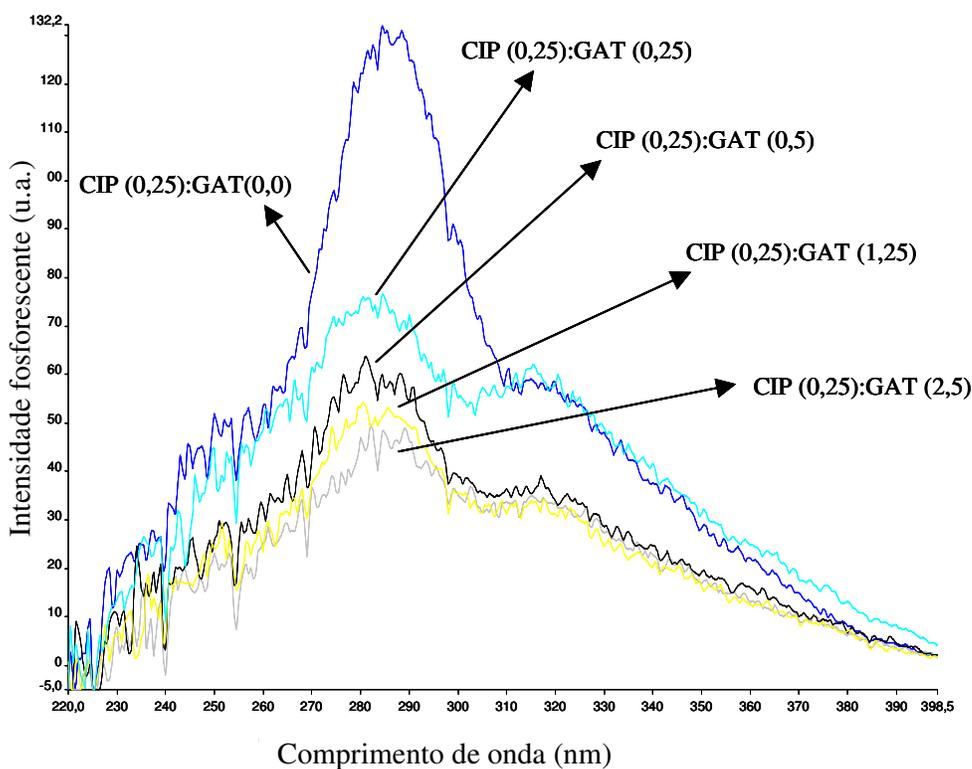


Figura 6.9. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da GAT no sinal da CIP com  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ :  $\Delta\lambda = 170$  nm e velocidade de varredura de  $600$  nm  $\text{min}^{-1}$ . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

Nas condições de indução de fosforescência da CIP por  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  não se observa sinal fosforescente para a GAT, indicando uma situação muito favorável do ponto de vista seletivo. Nesse caso, os resultados do estudo mostraram ausência de interferências para misturas contendo até duas vezes mais

quantidade de GAT. Para misturas contendo cinco ou dez vezes mais GAT, uma interferência de efeito filtro foi observada, o sinal fosforescente da CIP foi suprimido pela GAT (Tabela 6.6). Esse resultado pode ser observado nos espectros da Figura 6.10 onde os valores em parêntesis indicam a quantidade de CIP ou GAT em nmol.

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

Tabela 6.6. Estudo de interferência<sup>a</sup> da GAT no sinal fosforescente da CIP usando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ .

Proporção CIP <sup>b</sup> :GAT	Fosforescência (u.a)	$I_{\text{NOR}} / (I_{\text{CIP}} + I_{\text{GAT}})$
1:0	$126,54 \pm 3,03$	1,00
1:1	$129,09 \pm 3,83$	0,98
1:2	$128,18 \pm 2,58$	0,99
1:5	$40,59 \pm 2,55$	3,12
1:10	$30,53 \pm 5,54$	4,14

<sup>a</sup>Quantidade de CIP depositada no substrato: 0,25 nmol.

<sup>b</sup>Banda espectral de passagem de 10 nm.

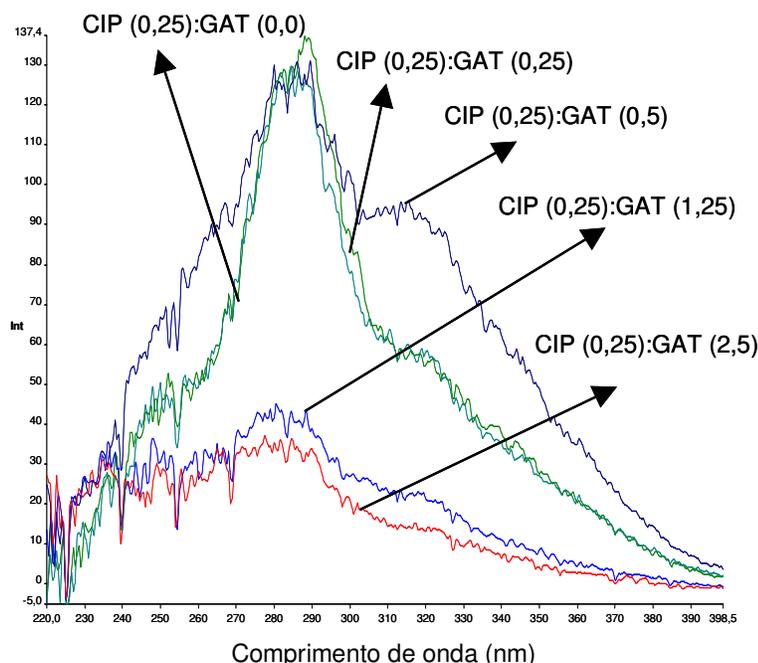


Figura 6.10. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da GAT no sinal da CIP com  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ :  $\Delta\lambda = 237$  nm e velocidade de varredura de  $600$   $\text{min}^{-1}$ . Valores em parêntesis são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

### 6.4.2. Estudo da interferência da MOX

Nas condições escolhidas para a CIP utilizando  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ , a MOX não apresentou sinal fosforescente, portanto era esperado que a MOX não interferisse nas bandas espectrais de excitação e de emissão da CIP (288/452 nm). Entretanto observou-se interferência através de efeito filtro ou por obstrução da interação entre as moléculas da CIP com este sal indutor de fosforescência, o qual pode ser visto na Tabela 6.7. Esta interferência foi significativa mesmo nas misturas contendo quantidades equimolares de CIP e de MOX. Esse resultado pode ser observado nos espectros da Figura 6.11, onde os valores em parênteses indicam a quantidade de CIP ou MOX em nmol.

Tabela 6.7. Estudo de interferência<sup>a</sup> da MOX no sinal fosforescente da CIP usando  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ .

Proporção CIP <sup>b</sup> :MOX	Fosforescência (u.a.)	$I_{\text{CIP}} / (I_{\text{CIP}} + I_{\text{MOX}})$
1:0	92,34 ± 2,56	1
1:1	62,08 ± 5,09	1,49
1:2	43,77 ± 3,19	2,11
1:5	32,34 ± 1,64	2,85
1:10	32,37 ± 2,55	2,85

<sup>a</sup>Quantidade de CIP depositada no substrato: 0,25 nmol.

<sup>b</sup>Banda espectral de passagem de 10 nm.

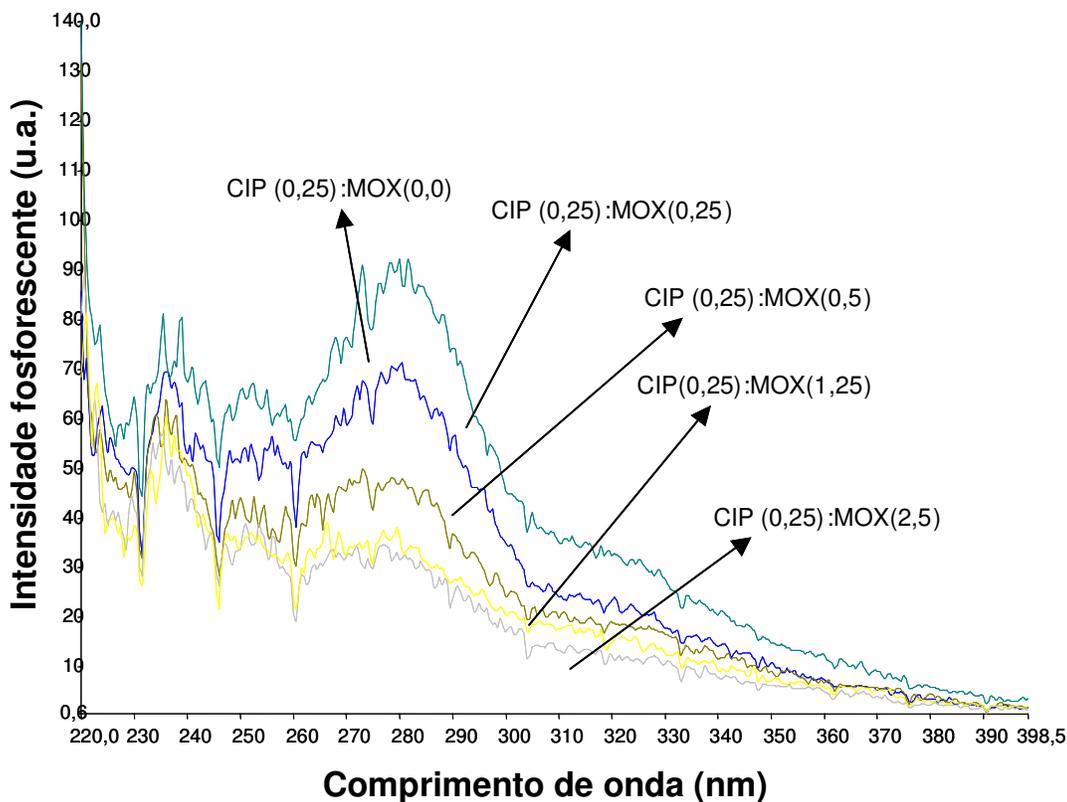


Figura 6.11. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da MOX no sinal da CIP com  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ :  $\Delta\lambda = 170 \text{ nm}$  e velocidade de varredura de  $600 \text{ min}^{-1}$ . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em  $\text{nmol}$ .

Nas condições de indução de fosforescência da CIP por  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  esperava-se não se observar sinal fosforescente para a MOX, como indicando nos estudos univariados, no entanto, após o ajuste de condições experimentais, a MOX passou a fosforescer e impor interferência espectral para amostras contendo cinco ou dez vezes mais quantidade de MOX. Nesse caso, os resultados do estudo mostraram ausência de interferências espectral e não-espectral para misturas contendo até duas vezes mais quantidade de MOX (Tabela 6.8). Esse resultado pode ser observado nos espectros da Figura 6.12 onde os valores em parênteses indicam a quantidade de CIP ou MOX em  $\text{nmol}$ .

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

Porém a interferência não espectral de CIP na presença de MOX utilizando o acetato de cádmio como sal indutor de fosforescência possibilitaria a determinação de CIP na presença de MOX, nas proporções estudadas, com o uso de adições padrões.

Tabela 6.8. Estudo de interferência<sup>a</sup> da MOX no sinal fosforescente da CIP usando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ .

Proporção CIP <sup>b</sup> :MOX	Fosforescência (u.a.)	$I_{\text{CIP}} / (I_{\text{CIP}} + I_{\text{MOX}})$
1:0	$152,96 \pm 2,53$	1
1:1	$153,04 \pm 3,26$	1,00
1:2	$158,34 \pm 4,58$	0,97
1:5	$230,68 \pm 2,66$	0,66
1:10	$322,37 \pm 5,12$	0,47

<sup>a</sup>Quantidade de CIP depositada no substrato: 0,25 nmol.

<sup>b</sup>Banda espectral de passagem de 10 nm.

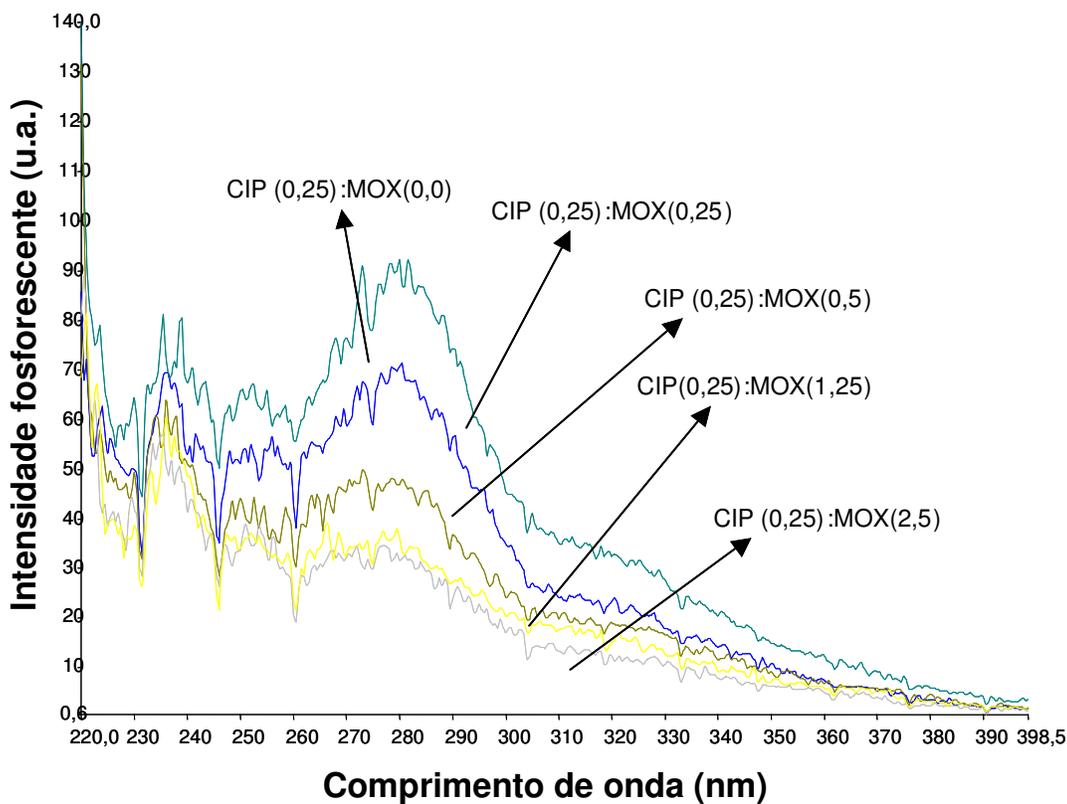


Figura 6.12. Espectro de varredura sincronizada obtidas no estudo de interferência da MOX no sinal da CIP com  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ :  $\Delta\lambda = 237$  nm e velocidade de varredura de  $600 \text{ min}^{-1}$ . Valores em parênteses são as quantidades depositadas no substrato em nmol.

### 6.4.3. Estudos em urina

Para avaliar o efeito da matriz urina no sinal fosforescente da CIP foi escolhida a condição experimental baseada no uso do  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ . Nesse caso, não se adicionou tampão, pois a condição ótima de pH para a CIP foi obtida com o pH natural da solução que ficou em torno de 5,8. A urina aumentou a acidez da solução e como correção para o pH, adicionou-se pequenos volumes de NaOH (10%) para ajuste do mesmo. Assim, em soluções testadas com maior quantidade de urina, a composição percentual em volume foi igual a 45% de urina, cerca de 0,10% de NaOH (10%) de tampão e o complemento de água. Nesse caso, o sinal fosforescente da CIP na urina foi cerca de 2 vezes menor que o sinal de um padrão de referência da CIP. O resultado obtido com o pré-tratamento de limpeza da urina com sulfato de amônio também diminuiu o sinal fosforescente da CIP em 2 vezes. Assim maiores diluições da matriz foram testadas, como mostrado na Tabela 6.9 e na Figura 6.13. Pôde se constatar que a minimização da interferência não-espectral provocada pela matriz biológica foi conseguida com o uso de 10% e 25% de urina em volume, porém optou-se em usar 10% de urina em volume. Dependendo da sensibilidade do método analítico empregado esse fator de diluição não implicaria na inviabilização da determinação de CIP em amostras de urina. Mais abaixo, os espectros de varredura sincronizada da CIP em meio aquoso e em urina contendo quantidades crescente de GAT e MOX, 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 6.13 e Figura 6.14).

Tabela 6.9. Teste de interferência da matriz urina no sinal fosforescente da CIP.

% de urina na amostra <sup>a,b</sup>	Fosforescência	$I_{\text{NOR}}/I_{\text{NOR em urina}}$
0% (padrão aquoso)	$116,88 \pm 2,91$	-
10%	$118,33 \pm 1,53$	0,99
25%	$116,00 \pm 1,91$	1,01
45%	$56,64 \pm 4,76$	2,06
45% com pré- tratamento <sup>d</sup>	$61,00 \pm 4,58$	1,92

<sup>a</sup>Todas as amostras continham 30% de tampão Britton-Robinson em volume

<sup>b</sup>Quantidade de CIP depositada no substrato: 0,25 nmol.

<sup>c</sup>Banda espectral de passagem de 10 nm.

<sup>d</sup>Limpeza da amostra com sulfato de amônio.

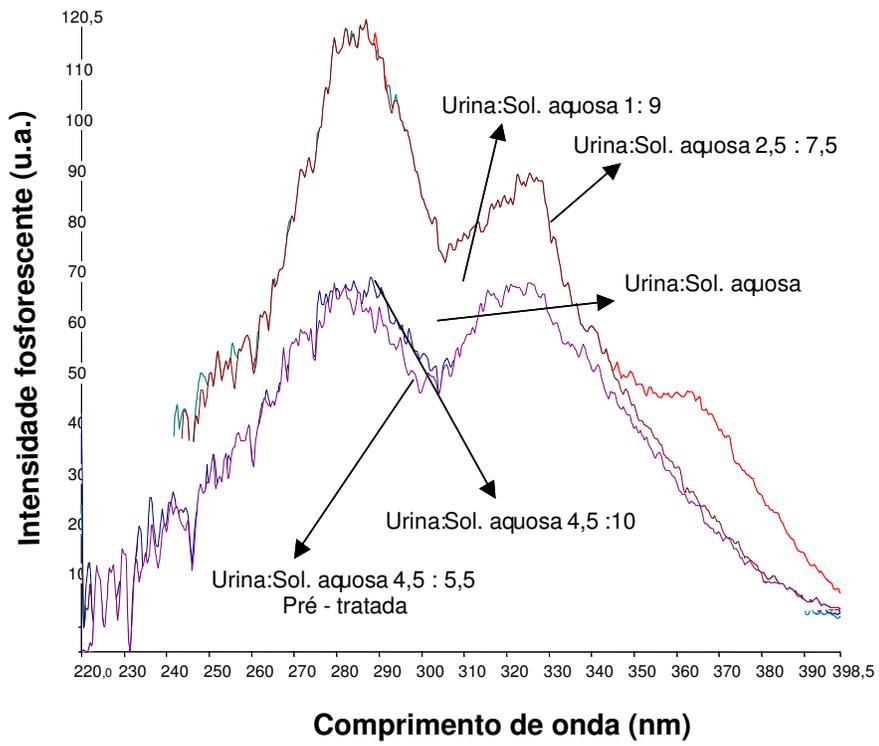


Figura 6.13. Estudos de interferência da urina na fosforescência de 80 ng de CIP utilizando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ :  $\Delta\lambda = 237 \text{ nm}$  e velocidade de varredura de  $600 \text{ nm min}^{-1}$ .

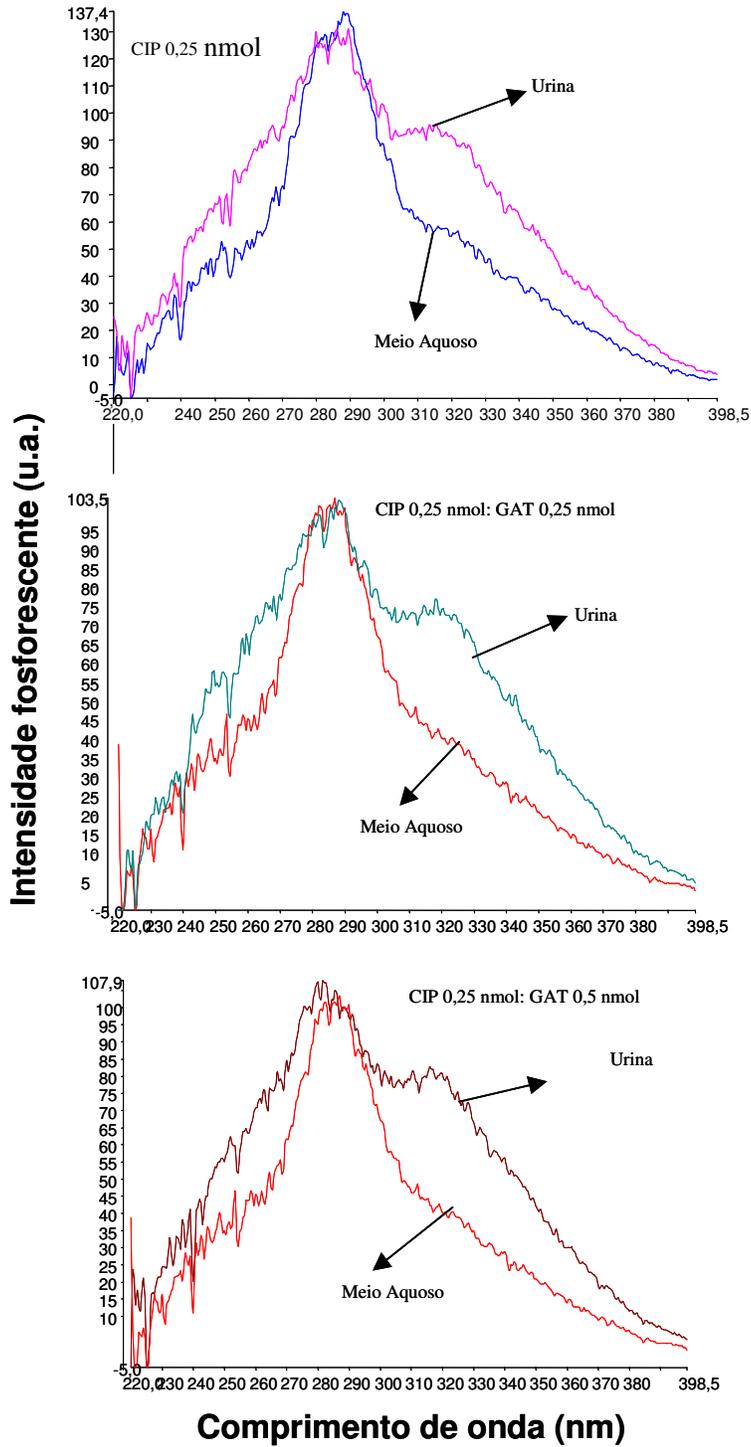


Figura 6.14. Comparação das medições do sinal da CIP por varredura sincronizada ( $\Delta\lambda = 237$  nm) em urina e em meio aquoso usando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  e quantidades crescentes de GAT como fluorquinolona-interferente.

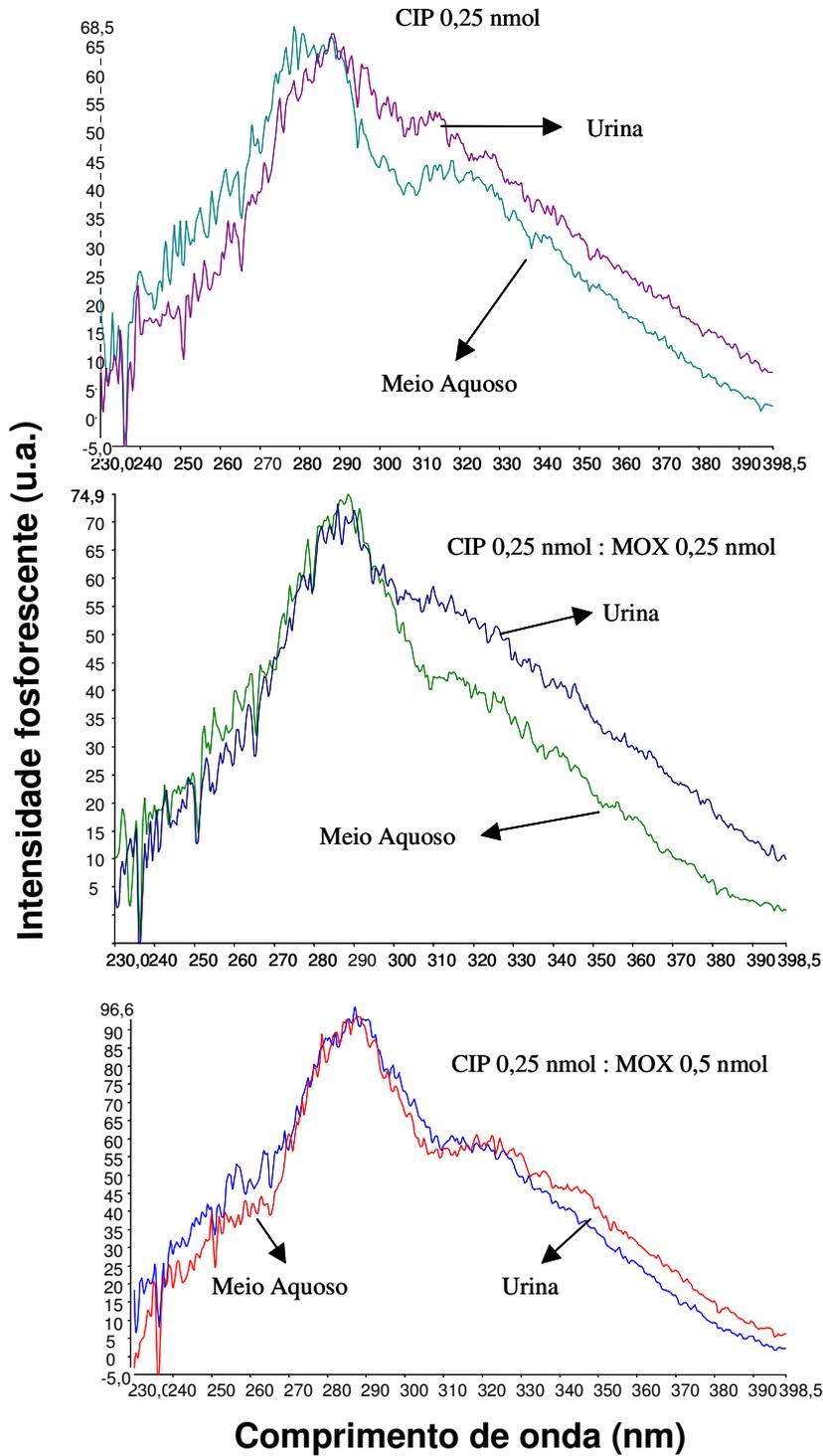


Figura 6.15. Comparação das medições do sinal da CIP por varredura sincronizada ( $\Delta\lambda = 237$  nm) em urina e em meio aquoso usando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  e quantidades crescentes de MOX como fluorquinolona-interferente.

## 6.5 Desempenho de métodos

O desempenho dos métodos analíticos fosforimétricos para determinação da CIP através das suas condições escolhidas 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. Duas situações foram avaliadas: (i) determinação de CIP usando nitrato de tório com sal indutor; (ii) determinação de CIP usando nitrato de cádmio como sal indutor. Os parâmetros de mérito de sensibilidade dos dois métodos para CIP foram comparados entre si.

### 6.5.1 Curvas analíticas e linearidade

Curvas analíticas foram construídas com o depósito de 5  $\mu\text{L}$  de soluções de concentrações crescentes de CIP (de  $1 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ). 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 6.10), 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 neste caso, também indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenadas está muito próxima do valor zero, indicando mínimos erros sistemáticos associados. Já os desvios padrões dos coeficientes angulares representam uma boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições. As Figuras 6.15 e 6.16 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 CIP depositados no substrato sólido em dois níveis de massa (Tabela 6.11).

Tabela 6.10. Parâmetros das curvas analíticas

Analito	Sal de átomo pesado	m	b	$r^2$
CIP	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$1,11 \pm 0,10$	$59,05 \pm 16,82$	$0,9936 \pm 0,0009$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$0,91 \pm 0,03$	$44,13 \pm 21,79$	$0,9946 \pm 0,0012$

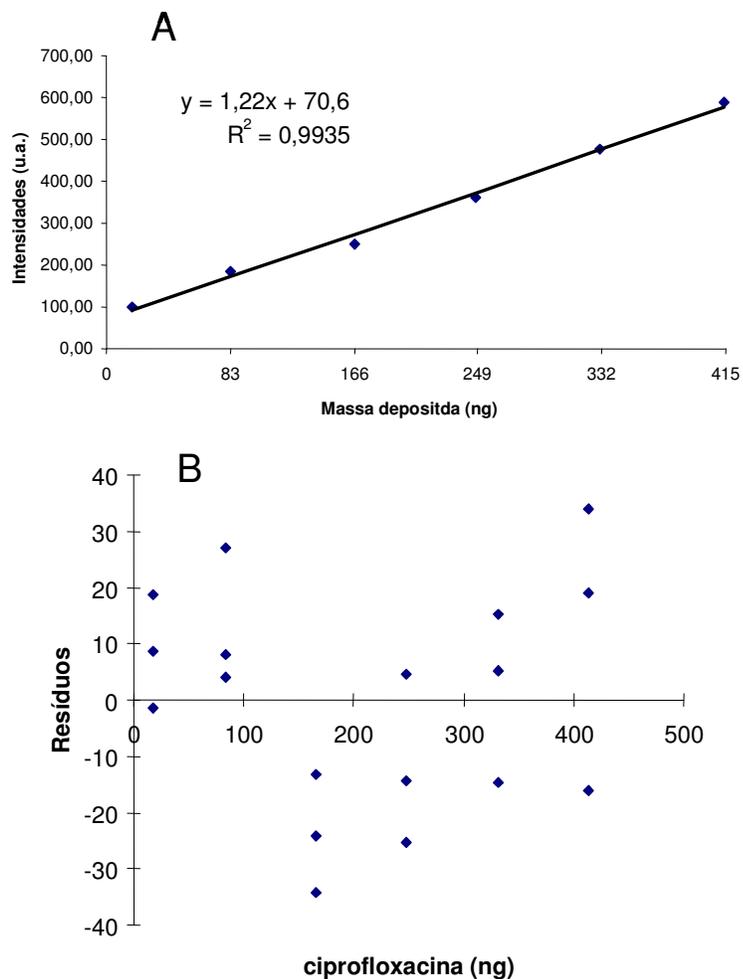


Figura 6.16 (A) Curva analítica da CIP - Fosforescência induzida por  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$  em função da massa de CIP depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

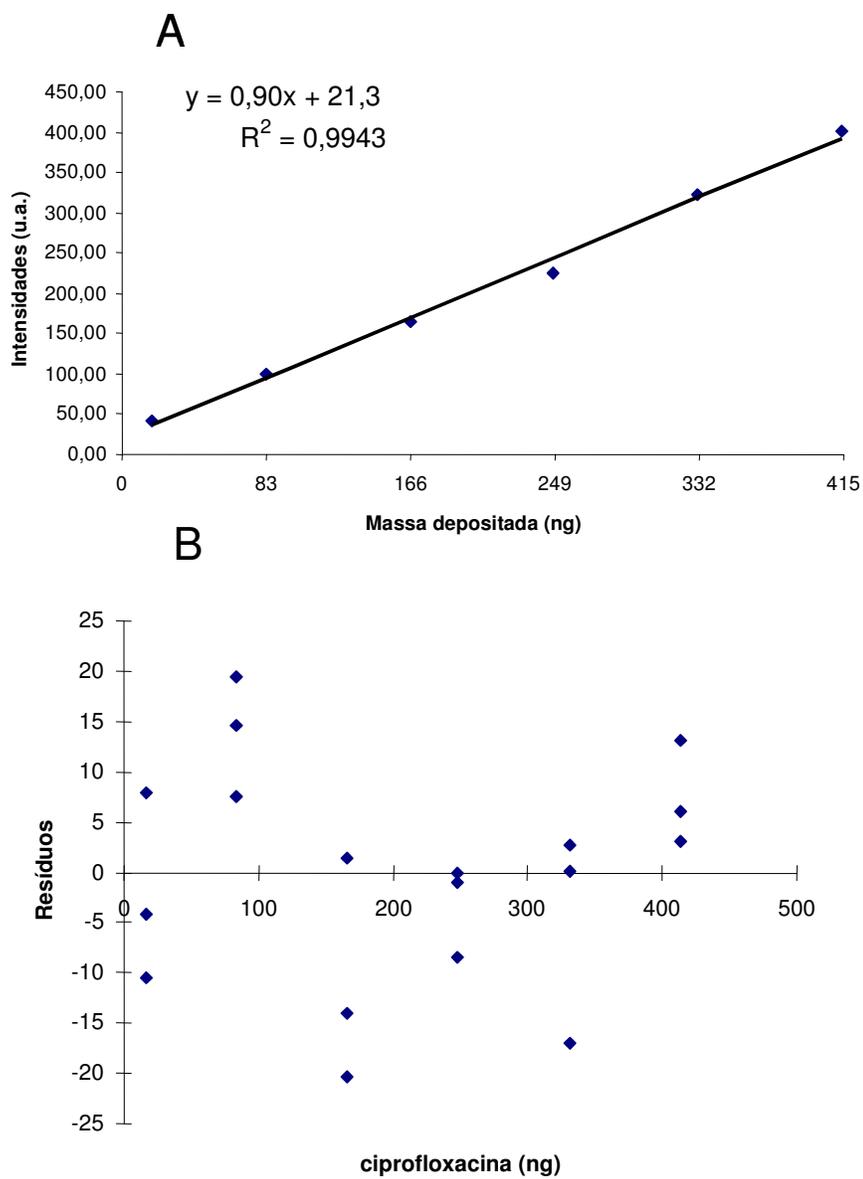


Figura 6.17. (A) Curva analítica da CIP - Fosforescência induzida por  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  em função da massa de CIP depositada no substrato de celulose. (B) Gráfico de resíduos.

Tabela 6.11. Estudos de precisão.

Analito	Sal de átomo pesado	Precisão	
		com 83 ng	com 331 ng
CIP	Cd(OAc) <sub>2</sub>	6,6%	3,2%
	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	4,9%	5,5%

### 6.5.2. Parâmetros de sensibilidade

Os valores de LDA e de LQA foram calculados para as duas situações de determinação da CIP (Tabela 6.12). 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 as duas situações da CIP.

Os resultados mostraram que as massas quantificáveis (LQA) de CIP foram da ordem de ng, indicando a sensibilidade do método proposto para este analito.

Tabela 6.12. Parâmetros de sensibilidade

Analito	Sal de átomo pesado	LDA	LQA
		(ng)	(ng)
CIP	Cd(OAc) <sub>2</sub>	$7,1 \pm 0,6$	$23,6 \pm 2,0$
	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	$9,6 \pm 0,3$	$31,7 \pm 1,4$

### 6.5.3. Testes de recuperação (exatidão)

Por último, foi avaliada a aplicabilidade do método através de testes de recuperação cujo valor da quantidade de analito recuperado é comparado com a quantidade depositada no substrato a partir de uma amostra cujo valor de analito é indicado (indicação da bula para as formulações farmacêuticas, ou a quantidade de padrão adicionado no caso da urina).

Três tipos de amostras foram testadas, o primeiro tipo foi referente a medicações farmacêuticas comercial contendo CIP; o segundo tipo é referente a simulações de formulações farmacêuticas constituídas pela mistura de CIP com diferentes quantidades de GAT ou MOX. As quantidades da substância concomitante adicionadas na formulação simulada foram: (i) quantidade

equimolar e (ii) quantidade duas vezes maior em mol. A terceira e último tipo de amostra foi a urina enriquecida com CIP ou contendo misturas CIP/GAT e CIP/MOX. Todas as amostras foram determinadas utilizando  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  e  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ . Os resultados das recuperações são a média obtida em determinações realizadas em três dias diferentes e podem ser observadas na Tabela 6.13, Tabela 6.14 e Tabela 6.15.

Tabela 6.13. Recuperação nas determinações em amostras de formulações farmacêuticas contendo CIP usando SS RTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Sal de átomo pesado	Recuperação
CIP	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$103,8 \pm 1,1\%$
	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$97,9 \pm 4,0\%$

Tabela 6.14. Recuperação nas determinações em amostras de formulações farmacêuticas simuladas contendo CIP como princípio ativo usando SS RTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Interferente (proporção analito:interferente)	Sal de átomo pesado	Recuperação
CIP	GAT (1:1)	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$102,8 \pm 8,8\%$
CIP	GAT (1:2)	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$97 \pm 10,8\%$
CIP	GAT (1:1)	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$56,4 \pm 47\%$
CIP	GAT (1:2)	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$22 \pm 77\%$
CIP	MOX (1:1)	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$94,3 \pm 3,6\%$
CIP	MOX (1:2)	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	$99 \pm 7,4\%$
CIP	MOX (1:1)	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$60,8 \pm 11,9\%$
CIP	MOX (1:2)	$\text{Cd}(\text{OAc})_2$	$36,3 \pm 38\%$

Tabela 6.15. Recuperação nas determinações em urina enriquecida contendo NOR ou LEV como princípio ativo usando SSRTP (média de três determinações).

Princípio ativo da formulação	Interferente (proporção analito:interferente)	Sal de átomo pesado	Recuperação
CIP	-	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	98,6 ± 3,3%
CIP	-	Cd(OAc) <sub>2</sub>	107,9 ± 2,8%
CIP	GAT (1:1)	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	105,3 ± 11,4
CIP	GAT (1:2)	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	99 ± 11,7
CIP	GAT (1:1)	Cd(OAc) <sub>2</sub>	51,2 ± 43%
CIP	GAT (1:2)	Cd(OAc) <sub>2</sub>	17,8 ± 10,6%
CIP	MOX (1:1)	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	94,3 ± 3,1%
CIP	MOX (1:2)	Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	100,3 ± 6,1%
CIP	MOX (1:1)	Cd(OAc) <sub>2</sub>	60,8 ± 13,4%
CIP	MOX (1:2)	Cd(OAc) <sub>2</sub>	37,3 ± 40%

Os resultados obtidos mostram claramente que o método utilizado para a determinação de CIP é adequado para ambos os sais indutores de fosforescência, não importando a presença de componentes da matriz real ou medicamentosa. Porém, em matrizes simuladas contendo GAT ou MOX, tanto em matrizes medicamentosas quanto em matrizes reais, ficou confirmado que o uso do nitrato de tório permitiu a determinação de CIP na presença de GAT até a proporção de um para dois, enquanto que o uso do acetato de cádmio promoveu recuperações muito abaixo do esperado. Logo, o método SSRTP baseado no uso de Th(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> pode ser utilizado para a determinação de CIP na presença de GAT, dentro da proporção estudada. Já nas misturas de CIP e MOX o uso do nitrato de tório mostrou-se mais eficiente até a proporção de um para dois, a partir dessa quantidade notou-se a existência de interferências espectrais que não podem ser contornadas. Para essa mistura de CIP e MOX obtidas com o acetato de cádmio as interferências geradas foram do tipo não espectrais em

todas as proporções estudadas, interferências estas que podem ser contornadas com a adição de analito.