

4

Resultados: Determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil.

4.1.

Considerações iniciais

A posição espectral, a intensidade e a forma de um espectro eletrônico molecular, em especial os fotoluminescentes, são determinados pela estrutura da molécula e pelo meio no qual estas moléculas se encontram. Estruturas moleculares rígidas e com sistema de elétrons π deslocalizados favorecem a desativação radiativa da energia fotônica previamente absorvida. Com relação ao meio, o sistema de solventes pode ter influência crítica, sendo o tipo (aprótico ou prótico) e o valor da constante dielétrica (ϵ) importantes parâmetros a serem considerados. Solventes polares próticos são solventes que possuem átomos de hidrogênio ligados a átomos fortemente eletronegativos. Este tipo de solvente se comporta como ácido fraco de Brønsted, doando prótons para um sítio básico (par de elétrons não compartilhados) da molécula. Já no solvente aprótico, não se encontram átomos de hidrogênio ligado a átomos fortemente eletronegativos, logo, este tipo de solvente costuma ter pares de elétrons não compartilhados, atuando desta forma como uma base fraca de Brønsted. Se o solvente interage com o soluto, seja doando ou recebendo um par de elétrons, modificações na estrutura eletrônica da molécula são esperadas, afetando a característica das transições eletrônicas e, portanto, o sinal fotoluminescente.

Solventes com diferentes valores de ϵ orientam diferentemente a molécula em solução. Cada modo de orientação da molécula possui uma energia associada, desta forma, orientações diferentes irão causar diferenças e alargamentos no sinal luminescente.

De forma similar, o pH do solvente influencia a forma como uma molécula pode ser protonada, mudando a configuração eletrônica da mesma, e por conseqüência, as suas propriedades luminescentes. Alterações de pH podem também ocasionar mudanças críticas na estrutura da molécula, promovendo a

formação de produtos que podem ser mais ou menos luminescentes do que a espécie química original.

4.2. Fluorescência natural do ciclofenil e do seu derivado fotoquímico.

Devido à baixa solubilidade do ciclofenil em água, os testes preliminares sobre sua fluorescência foram realizados em solução metanólica. Neste solvente, foi observada fluorescência de baixa intensidade (com picos de excitação/emissão em 380/410 nm) como pode ser observado na Figura 13.

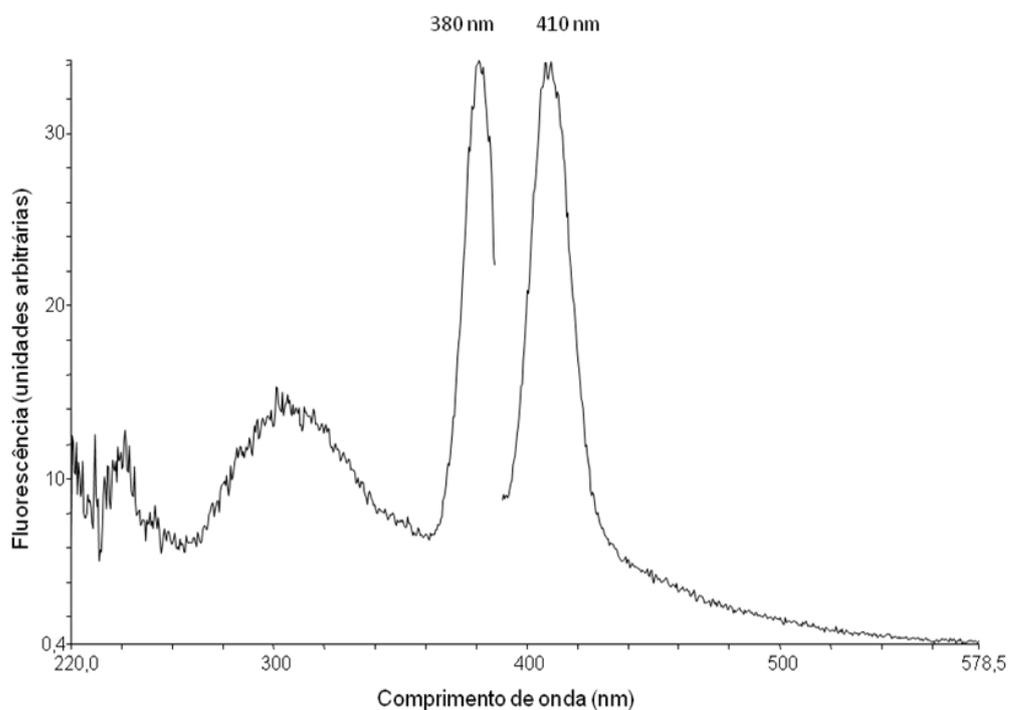


Figura 13 - Espectro de excitação e emissão de uma solução $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ciclofenil em metanol com intensidades máximas em 380/410 nm.

4.3. Fluorescência do derivado fotoquímico do ciclofenil

Hassam ¹³, em trabalho envolvendo espectrofotometria molecular, demonstrou a instabilidade do ciclofenil em solução aquosa. A influência da radiação UV sobre o espectro de absorção molecular do ciclofenil dissolvido em metanol também já foi reportada, sendo observado um deslocamento hipsocrômico na banda de absorção de 380 para 310 nm e um incremento de 150% na intensidade de absorvância após apenas 60 min de exposição da solução à radiação UV ⁶⁶ Essas alterações nas características espectrais indicam modificações na estrutura da molécula do ciclofenil. Com base nestes conhecimentos prévios decidiu-se por estudar o efeito da radiação UV no espectro luminescente do ciclofenil.

O espectro fluorescente do ciclofenil irradiado com UV indicou a formação de um fotoderivado com sinal (305/400) mais intenso (maior eficiência quântica fluorescente) devido provavelmente à uma reação de quebra da molécula original formando uma ou mais estruturas mais compactas e rígidas. Na Figura 14 é mostrado o espectro fluorescente para uma solução de ciclofenil irradiada com UV por 60 min, onde se observa comprimentos máximos de excitação e de emissão em 310/410 nm. O espectro de fluorescência dessa mesma solução de ciclofenil, porém antes da irradiação, é também encontrado na Figura 14, nas mesmas condições de varredura escolhidas foram para a solução irradiada (310/410 nm).

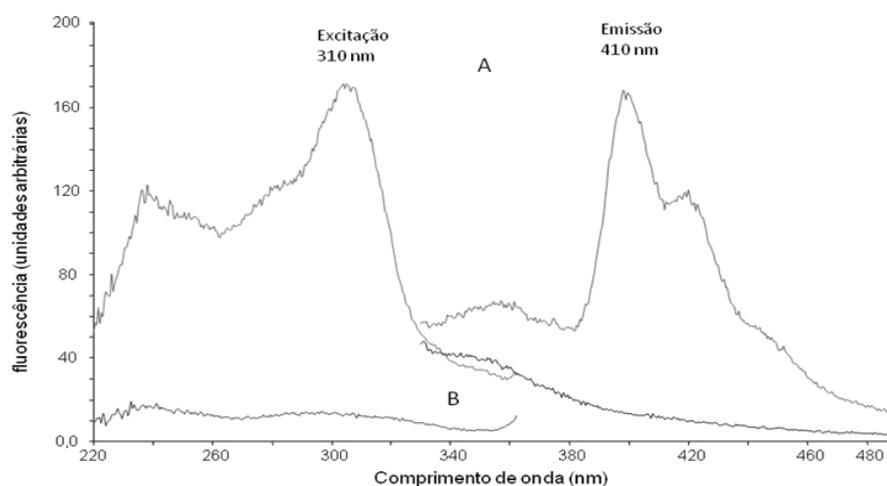


Figura 14 – Espectro fluorescente de uma solução $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ciclofenil (B) original e (A) após 60 min de exposição ao UV.

4.3.1. Estudo de tempo de irradiação do ciclofenil com UV

Tendo sido constatada o aumento do sinal fluorescente do ciclofenil após exposição ao UV (fotoderivação do analito), a próxima etapa do trabalho foi estudar o efeito do tempo de exposição do analito ao UV. Para tal, usou-se uma solução de ciclofenil ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) que foi dividida em várias alíquotas, colocadas em tubos de quartzo e, cada uma, irradiada por um intervalo de tempo diferente (indicado na Figura 15). Pode-se observar um aumento de sinal em duas etapas, conforme indicado pelos dois platôs de sinal entre, aproximadamente 20 e 60 min e entre aproximadamente 120 e 180 min. Esse tipo de comportamento é um indicador de que a reação de fotoderivação do ciclofenil pode estar se processando em duas etapas. Máximo sinal fluorescente foi observado a partir de 120 min de irradiação com UV.

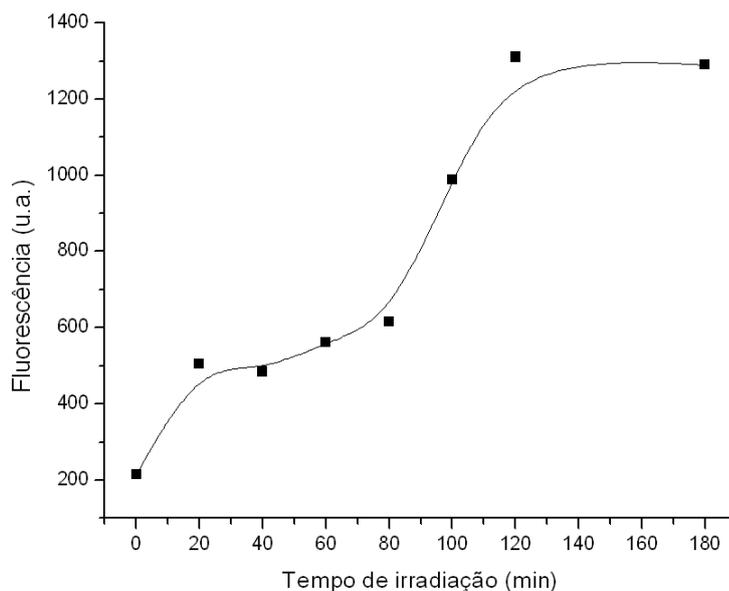


Figura 15: Influência do tempo de irradiação sobre a fluorescência do ciclofenil.

Em termos de tempo do processo analítico, 150 min para a realização da fotoderivação é um tempo relativamente longo. Assim, alguns testes foram realizados na tentativa de se reduzir o tempo de reação. Uma das tentativas consistiu em se aumentar o fluxo radiante que chegava às amostras. Para tal,

utilizou-se um reator contendo uma lâmpada de 125 W, de estrutura e geometria similar ao reator de 24 W de potência radiante, usado no experimento anterior. Nesse caso, observou-se um grande aquecimento da solução, o que provocava, em muitos casos, a ruptura da tampa dos tubos de quartzo por causa do aumento da pressão de vapor do solvente. Nas soluções onde se conseguiu evitar tal ruptura, não foi observada nenhuma alteração significativa em relação ao resultado obtido com o reator de 24 W.

Outra tentativa consistiu na utilização de TiO_2 , um conhecido catalisador para reações foto-redox. A reação redox é um dos vários tipos de mecanismos possíveis para uma reação fotoinduzida. Imaginando que o mecanismo da reação fosse desta natureza, foi adicionada à solução metanólica de ciclofenil, uma certa quantidade de TiO_2 , pois segundo Fox e Dulay ⁶⁷, este composto, disperso na solução, pode ser capaz de fornecer superfícies de contato com o espécie química de interesse de modo a se obter ambiente favorável para reações redox rápidas. Assim, diferentes quantidades do óxido foram misturadas com alíquotas de solução de ciclofenil $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e irradiadas por 30 min no reator de 24 W de potência radiante.

No entanto, o óxido se mostrou muito pouco solúvel em solução metanólica, e o resultado foi que as partículas presentes na solução refratavam a radiação ultravioleta, impedindo que a mesma incidisse na solução, como consequência, as soluções que continham TiO_2 produziram sinais luminescentes menos intensos quando comparada ao sinal observado das soluções de ciclofenil sem a adição do óxido. Por causa disso, esse tipo de abordagem foi abandonado.

4.3.2.

Estudo da influência do solvente e do pH no sinal fluorescente do fotoderivado do ciclofenil

Para estudos da influência do sistema de solventes e do pH no sinal do fotoderivado do ciclofenil, utilizou-se diferentes misturas aquosas de etanol, o que possibilitou a variação do pH das soluções tampão Britton-Robinson adicionadas ao sistema de solventes (fase aquosa). Foi verificado que o pH da solução influenciou tanto na intensidade das bandas de emissão e de excitação quanto na posição das mesmas no espectro. Além disso, foi observado que a razão metanol/água também exerce influência sobre a intensidade e sobre a posição das bandas luminescentes. A Figura 16 apresenta o resultado do estudo de pH para duas condições diferentes de solvente, uma na qual a solução era composta com 10%, em volume, de metanol e a outra na qual a solução tinha uma proporção maior de metanol (50%, em volume). Nota-se a tendência de aumento de sinal para as soluções com mais metanol ao se aumentar o pH do meio. Tendência contrária é observada para soluções com menor proporção de metanol. A luminescência do fotoderivado do ciclofenil em meio contendo 50% de metanol é maior que a do sinal observado em meio contendo 10% metanol, como pode-se observar na Figura 16. Na Figura 17 observa-se também o efeito da mudança do pH na banda de emissão fluorescente em soluções contendo 50% metanol.

Para uma maior compreensão da influência do pH e da proporção de solventes, um estudo mais detalhado foi realizado, desta vez, um maior número de proporções para o sistema de solventes foi usado, variando o pH da fase aquosa do sistema em apenas 3 valores (4, 8 e 10). O resultado deste estudo está apresentado na Figura 18.

Esse segundo estudo indicou que maiores sinais fluorescentes são encontrados em sistemas contendo tampão em pH mais básico (pH 10) para sistemas de solvente contendo menor proporção de fase aquosa (90% de metanol).

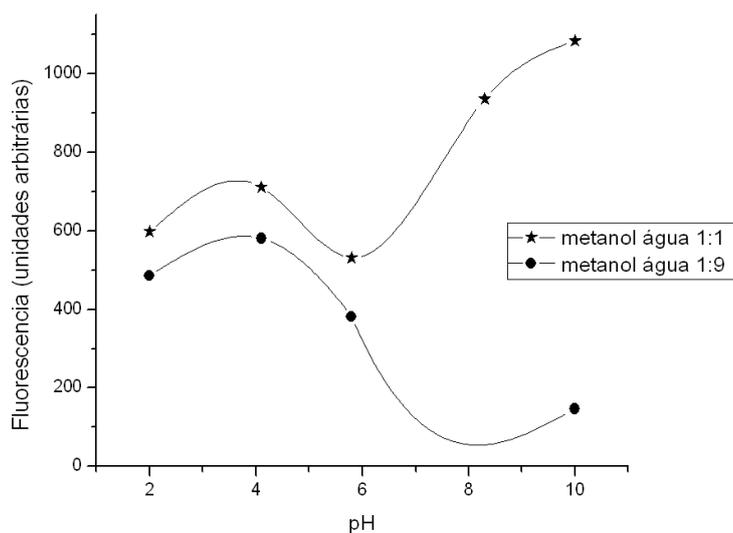


Figura 16: Influência do valor de pH da solução aquosa para $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ciclofenil para dois sistemas de solvente metanol/fase aquosa 50/50% v/v (1:1) e metanol/fase aquosa 90/10% v/v (9:1).

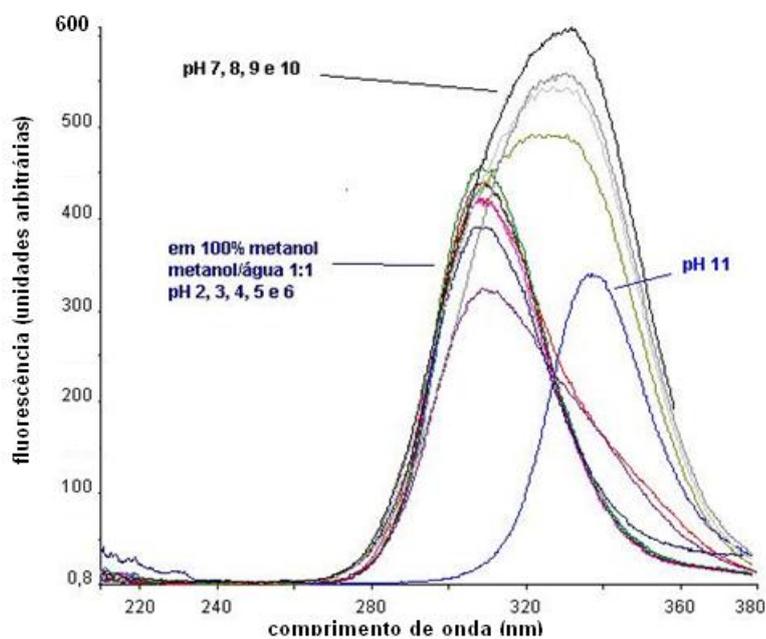


Figura 17 – Espectro de excitação fluorescente para solução de ciclofenil ($5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em sistemas de solvente metanol/fase aquosa 50/50% em diferentes valores de pH da fase aquosa. O espectro do ciclofenil em metanol é também indicado.

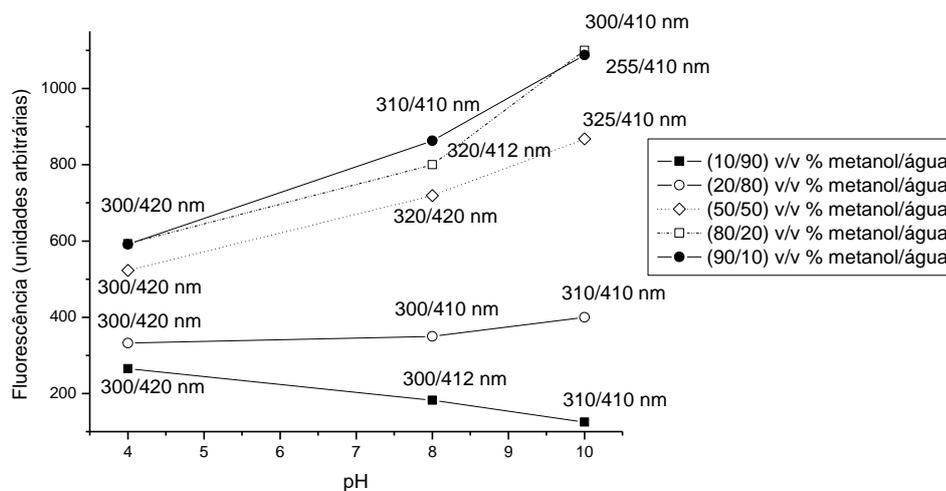


Figura 18 – Influência do valor de pH da fase aquosa em sistemas de solventes com diferentes proporções metanol/água na intensidade e nos máximos de excitação e de emissão fluorescentes.

4.3.3.

Otimização multivariada de fatores que afetam o sinal fluorescente do fotoproduto do ciclofenil.

Até este ponto se tem um conhecimento do efeito isolado que cada um das variáveis tidas como importantes (pH, tempo de irradiação UV e composição do solvente) têm sobre o sinal de fluorescência do fotoderivado do ciclofenil. Com base nos resultados dos estudos univariados, foi possível fazer a otimização destes fatores. No entanto, nesta abordagem de otimização, não são levadas em consideração as possíveis interações entre as diferentes variáveis, sejam elas sinérgicas ou antagônicas, o que poderiam mascarar as condições para obtenção do máximo verdadeiro⁶⁸. Assim sendo, planejamentos experimentais foram realizados.

No planejamento experimental, os experimentos são realizados de forma a se conseguir uma combinação de todas as variáveis capazes de influenciar a resposta do sistema em todos os níveis, conseguindo desta forma uma análise de uma variável sujeita a todas as combinações das outras variáveis. Isto possibilita não só fazer a previsão da interação das variáveis⁶⁹ como também verificar se estas variáveis realmente são importantes do ponto de vista estatístico. O resultado deste estudo é que, ao se confirmar a importância das variáveis e verificar as interações entre os mesmos, consegue-se obter um máximo verdadeiro para o sistema. Para que o planejamento possa ser realizado de forma eficaz, um prévio conhecimento do comportamento do sistema se faz necessário. No caso desse trabalho, os resultados do estudo univariado dão subsídios para tal.

Com base nos resultados dos estudos univariados, resolveu-se fazer um estudo multivariado usando as variáveis tidas até aqui como importantes: (i) o tempo de exposição à radiação ultravioleta, (ii) o pH da fase aquosa, e (iii) a composição do sistema de solventes. Para simplificar a notação, a composição do sistema de solventes foi indicada apenas como o volume de fase aquosa (tampão), em mL, sendo o complemento o metanol, já que a solução final, nestes estudos, tinha sempre o volume final de 10 mL.

Para realizar este estudo, foi escolhido um planejamento experimental do tipo 3^3 . Neste tipo de planejamento, os 3 fatores são avaliados em 3 níveis diferentes, níveis baixo (0), médio (1) e alto (2). A grande vantagem de um planejamento do tipo 3^3 sobre um planejamento 2^3 é que o primeiro leva em

consideração a curvatura do modelo sistema ⁷⁰ (ou seja, as possíveis interações quadráticas), fato que pode ser especialmente importante quando se está próximo do máximo verdadeiro. O formato de um planejamento completo do tipo 3^3 está representado na Figura 19.

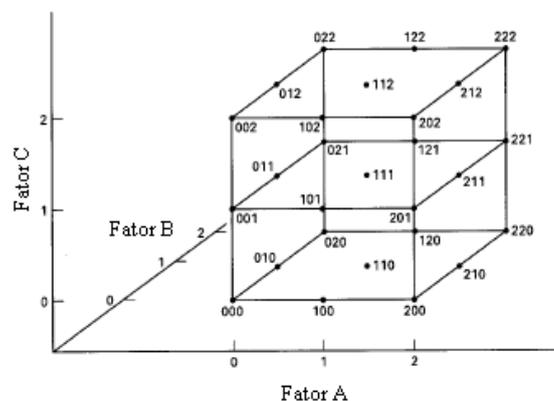


Figura 19 – Planejamento experimental 3^3 .

As variáveis utilizadas para realizar este planejamento (e seus valores) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – fatores e níveis escolhidos para o primeiro planejamento experimental.

Variável	0	1	2
pH	6	8	10
UV	120	150	180
Volume da fase aquosa	1	2	3

As análises foram feitas aleatoriamente, para evitar que a influência de erros sistemáticos nos resultados, e todas as soluções foram preparadas em duplicata. O programa utilizado para se efetuar o planejamento completo dos dados bem como os cálculos foi o módulo “Experimental Design” do programa de estatística Statistica 6.0 Statsoft. Com este programa foi possível aplicar o Planejamento Padrão Box Hunter $3 \times (K-p)$. Enquanto que para o modelo estatístico o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi o erro puro.

Um modo informativo para a apresentação de resultados, que é gerado pelo software, é o gráfico de Pareto. Neste gráfico, são mostradas a contribuição de todas as variáveis, suas interações, e o ranking da importância estatística de cada

um deles no sistema. A Figura 20 mostra o gráfico de Pareto resultante do planejamento 3^3 , onde a grande contribuição quadrática do tempo de exposição à radiação ultravioleta é indicada. Adicionalmente, as contribuições da interação entre o tempo de irradiação e o pH, a contribuição linear do volume da fase aquosa e a contribuição linear do pH são também considerados estatisticamente relevantes, porém com menor influência. As curvas de nível para as variáveis, organizados dois a dois podem ser visualizada nas Figuras 9, 10 e 11.

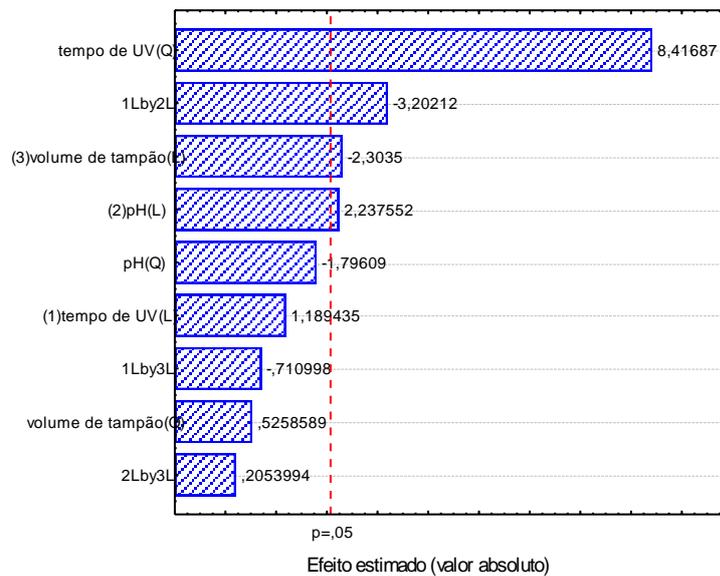


Figura 20- Gráfico de Pareto para o 1º planejamento experimental.

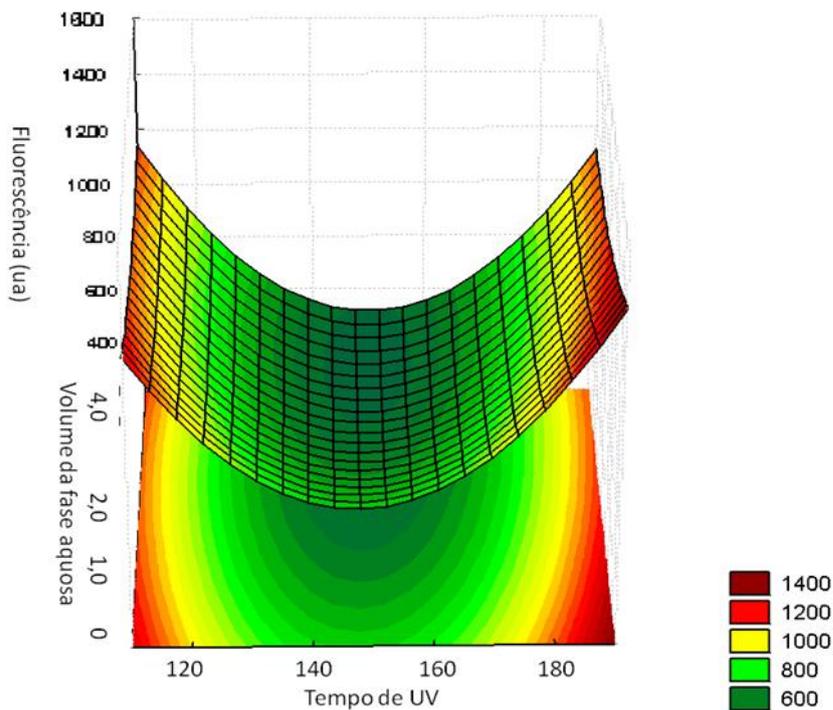


Figura 21 – Curva de nível para a fluorescência do fotoderivado do ciclofenil em função do volume da fase aquosa e tempo de UV

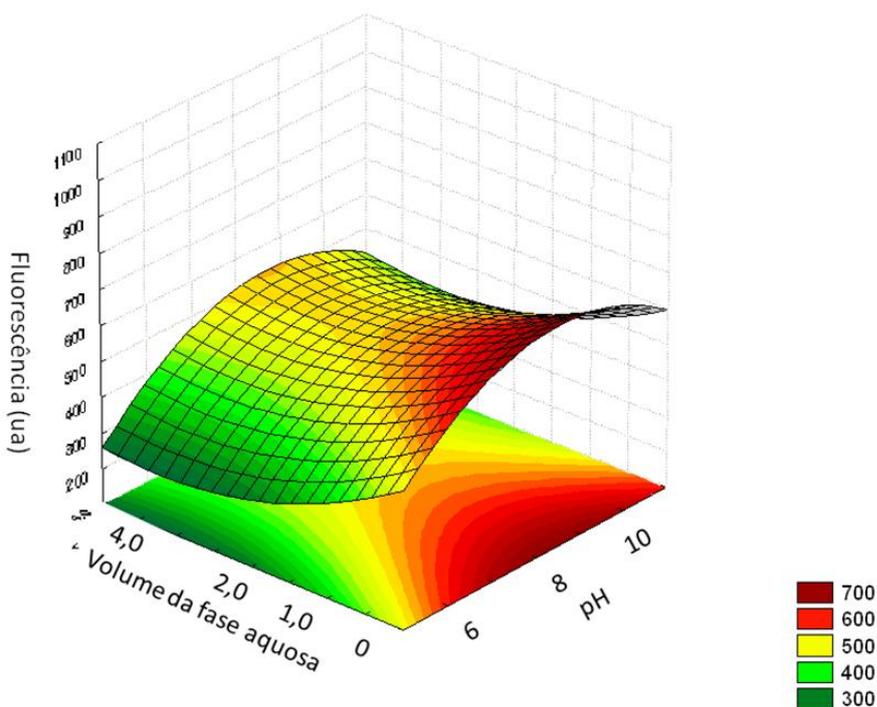


Figura 22 – Curva de nível para a fluorescência do fotoderivado do ciclofenil em função do volume da fase aquosa e pH

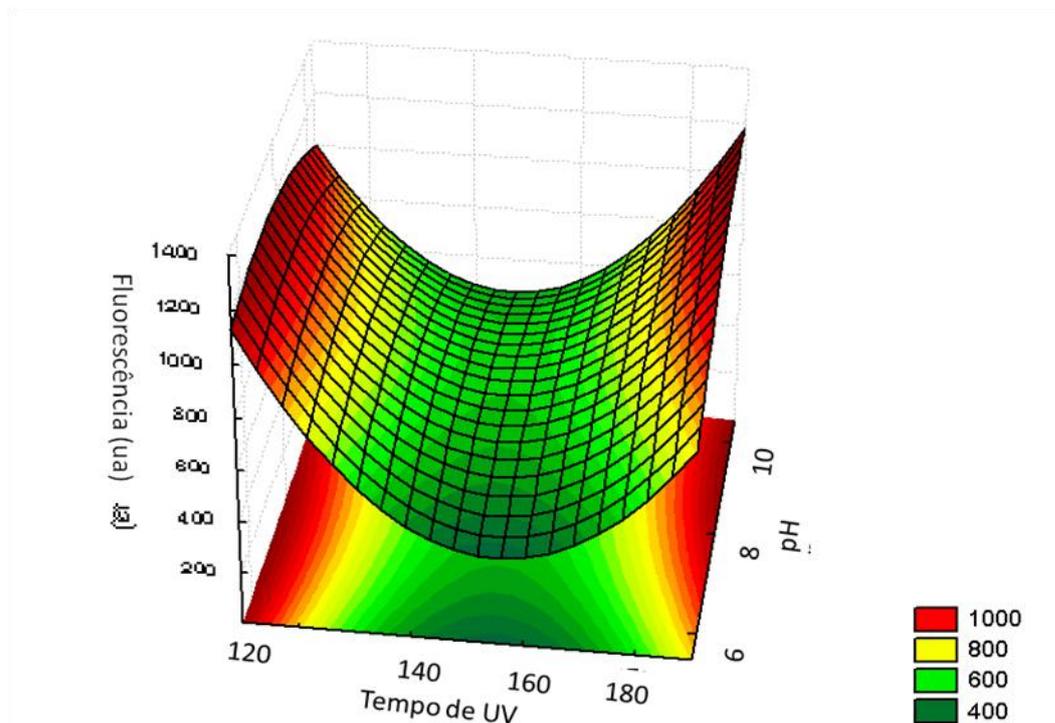


Figura 23 – Curva de nível para a fluorescência do fotoderivado do ciclofenil em função do tempo de UV e pH

A curva de nível é o resultado gráfico obtido pela metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, Response Surface Methodology). Este gráfico mostra a contribuição das variáveis (organizados sempre aos pares) de forma que a condição ótima, quando atingida, aparece como o máximo da função (superfície). Caso a região de máximo não seja claramente observada, pode-se localizar a região ou regiões onde se indica(m) a(s) tendência(s) de crescimento de sinal, e a partir dessa informação, ajustar a faixa dos fatores envolvidos no experimento para que se obtenha a condição ótima do experimento em uma nova superfície de resposta. Esse processo pode-se repetir várias vezes.

Pela Figura 21 (tempo de UV versus volume de tampão) e pela Figura 23 (tempo de UV versus pH do tampão) pode-se verificar que a condição ótima para o sistema ainda não foi atingida, e que a região central da superfície foi, na verdade, um vale para o fator tempo de UV. Em função disso e também objetivando uma diminuição no tempo de análise, o planejamento experimental seguinte foi realizado deslocando o nível médio do planejamento para 120 min.

Outro fator que justifica a utilização do tempo de 120 minutos, é o estudo univariado do tempo de exposição a radiação UV (figura 15). Nesta figura pode-se observar que o tempo de 120 minutos é justamente o início do platô de maior sinal fluorescente em função do tempo de UV.

A contribuição do volume da fase aquosa pode ser analisada mais claramente pela Figura 22, onde se pôde constatar a região de máximo seria obtido utilizando menores valores de fase aquosa. Como a fase aquosa em questão é justamente o tampão, foi considerado neste trabalho que um percentual de 10% do tampão é o mínimo necessário para o sistema, e por isso, esse volume foi escolhido como condição ótima e o fator eliminado do próximo planejamento. Na Figura 22, a condição de máximo em função do pH está próximo de 8, por isso, para o próximo planejamento, este valor foi mantido como valor para o nível médio.

O planejamento experimental Box-Wilson de corpo central circunscrito (CCC) para um sistema com duas variáveis foi escolhido como etapa seguinte da otimização. Esse planejamento, partindo de um sistema com duas variáveis (tempo UV e pH), foi do tipo 2^2 , o que produz cinco níveis para cada fator na disposição que pode ser visualizado na Figura 24 (fator x_1 versus fator x_2) onde dois quadrados, um disposto a 45° em relação ao outro incorpora quatro pontos (afastados a $\sqrt{2}$ do centro) aos quatro originais nos vértices do quadrado de referência (quadrado de linha cheia na Figura 24). Além desses pontos, é acrescentado um ponto central (0,0), somando um total de 9 pontos, cada um equivalendo a uma combinação de níveis para os fatores experimentais. A combinação desses níveis para a realização do segundo planejamento experimental está exposta na Tabela 3.

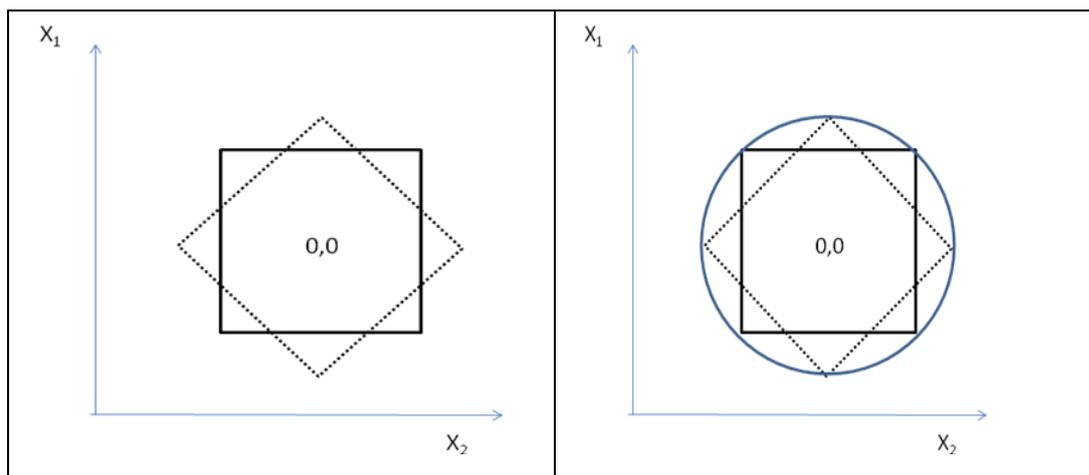


Figura 24 – Representação esquemática de um planejamento de corpo central CCC.

Tabela 3 – Variáveis e níveis escolhidos para o segundo planejamento experimental.

variável	$\sqrt{2}$	+1	0	-1	$-\sqrt{2}$
pH	10,8	10	8	6	5,2
Tempo de irradiação UV	204,8	180	120	60	35,2

Da mesma forma que como para o primeiro planejamento, as análises foram feitas aleatoriamente. De acordo com este planejamento, foram feitas leituras de soluções de ciclofenil $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando 1 mL de volume de tampão. Foram realizadas triplicatas apenas do ponto central.

Com base nos resultados obtidos deste planejamento, pode-se montar um modelo que descreve o comportamento deste sistema de forma mais adequada, facilitando a visualização da condição ótima de análise. A descrição matemática de um modelo quadrático que apresenta uma resposta (\hat{y}) para um sistema com duas variáveis (x_1 e x_2) é dado pela equação geral:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon(x_1, x_2)$$

Sendo que x_1 e x_2 são as variáveis principais, $x_1 x_2$ é a interação linear entre estes efeitos, x_1^2 e x_2^2 são as contribuições quadráticas dos efeitos principais, os coeficientes β_n são os valores populacionais dos efeitos (e de suas interações), e $\varepsilon(x_1, x_2)$ é o erro aleatório associado a resposta $y(x_1, x_2)$.

Como é impossível a determinação dos coeficientes β (uma vez que eles são valores populacionais, seria preciso uma quantidade infinita de procedimentos para sua determinação), usa-se apenas uma estimativa destes parâmetros. Ignorando o erro da medida, a equação geral é descrita da seguinte forma:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Por meio do programa utilizado para realizar este planejamento experimental, foi possível obter os valores dos efeitos, resultando na equação que descreve o modelo em questão:

$$I = 806.4 + 98.3(\text{UV}) - 210(\text{UV})_2 + 148.5(\text{pH}) - 52.3(\text{pH})_2 - 57.1(\text{UV})(\text{pH})$$

Sendo I a intensidade do sinal fluorescente (em unidades arbitrárias), (UV) o tempo de irradiação ultravioleta (em minutos), e pH o valor de pH da fase aquosa do sistema. Utilizando a derivada parcial para resolver esta equação determinou-se os valores ótimos para a condição analítica. São eles: tempo de irradiação de 122.6 minutos e pH 10,8. A análise das superfícies de resposta confirma que já se atingiu a condição ótima de análise (Figura 25).

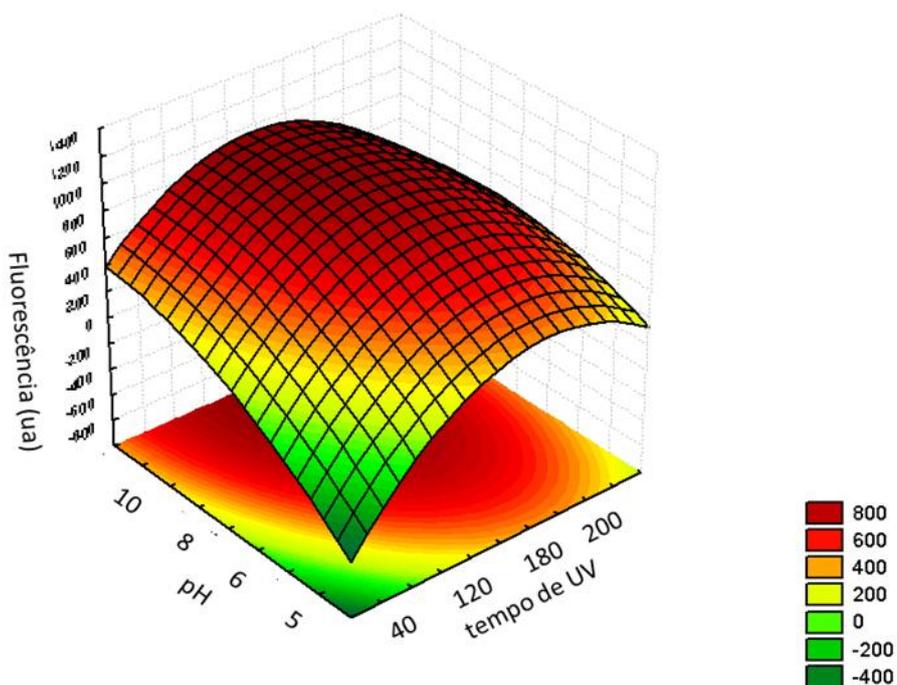


Figura 25 – Superfície de resposta em função do tempo de UV e do pH.

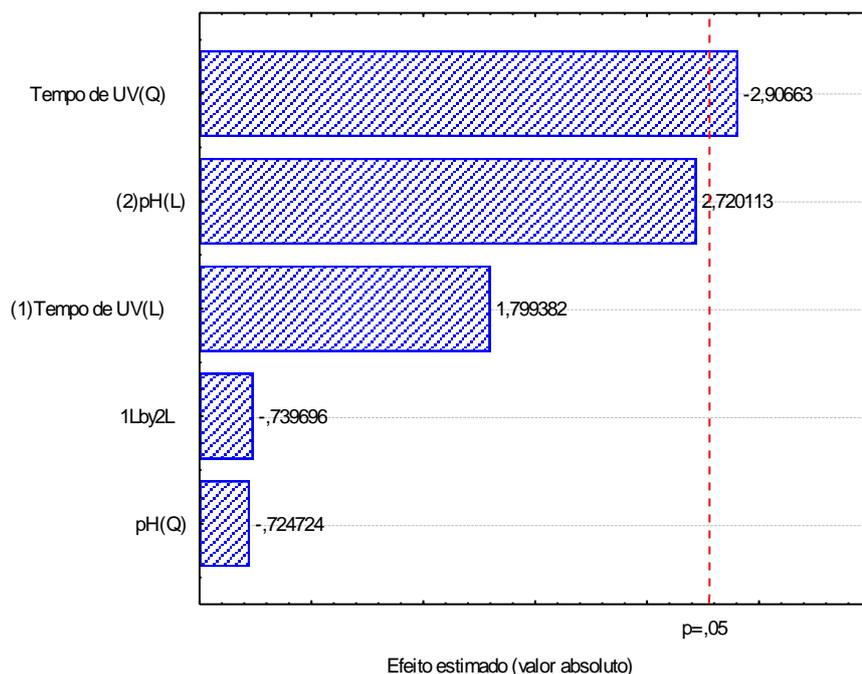


Figura 26- Gráfico de Pareto para o segundo planejamento experimental.

Embora o gráfico de Pareto (Figura 26) indique que um pequeno ajuste em direção da condição ótima poderia ser obtida com pequenas variações no valor do tempo de UV, e que o valor de pH esta praticamente no limite do valor estudado, as condições obtidas por este último planejamento experimental foram confirmados pelo teste de robustez, ao invés de se tentar um novo planejamento.

O valor do pH de três soluções de ciclofenil foi ajustado em diferentes valores (10,5; 10,8 e 11) e medidas em triplicata. O resultado não indicou nenhuma diferença estatística (n=3, 95%). O mesmo teste foi realizado para avaliar o tempo de UV, soluções de ciclofenil de mesma concentração foram irradiadas por 115, 120 e 125 min não sendo, novamente, registrada nenhuma diferença estatística entre os sinais fluorescentes (n=3, 95%).

A Figura 27, apresenta um espectro de fluorescência registrado nas condições experimentais otimizadas (Tabela 3) para uma solução de ciclofenil $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

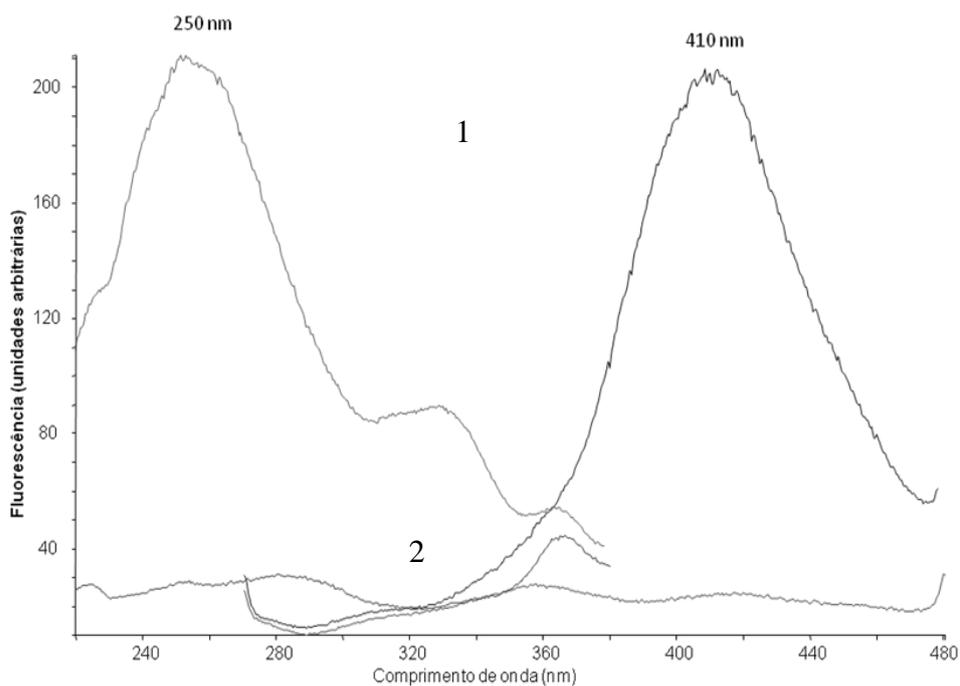


Figura 27 - Espectros para uma solução de ciclofenil $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, solução 10% água, 90% metanol, pH 10, no caso de: (1), irradiado por 2h e (2) não irradiado

Tabela 4 – Condições otimizadas para determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil.

Parâmetro	Condição escolhida
Sistema de solventes	Metanol/tampão Britton-Robinson 90/10% v/v
pH do tampão	10,8
Tempo de exposição a radiação UV	122.6 min

4.4.

Proposta para a formação do fotoderivado do ciclofenil

No intuito de sugerir um mecanismo para a formação do fotoproduto do ciclofenil, alguns experimentos foram realizados. O primeiro foi analisar amostras de ciclofenil irradiada (nas condições otimizadas) por GC-MS. O objetivo em se usar esta técnica, é o de aproveitar a capacidade do espectrômetro de massa de identificar razões massa/carga (m/z) dos fragmentos da molécula, permitindo verificar diferenças no perfil de fragmentos na solução de ciclofenil irradiada em relação à solução não-irradiada. Apesar de não se encontrar, na solução irradiada, nenhum fragmento com m/z diferente dos encontradas na solução não-irradiada, observou-se diferenças nas quantidades relativas para alguns dos fragmentos. O pico original do ciclofenil (m/z 364,02 Da) foi observado no tempo de retenção de 34,08 min. Na solução irradiada, a intensidade desse pico diminuiu. Por outro lado, no tempo de retenção de 33,15 min., verificou-se um aumento, da ordem de quatro vezes, da intensidade do fragmento com m/z 322 Da e da sua seqüência de fragmentação, em especial o fragmento m/z 280 Da (Figura 28). Esta informação poderia indicar que estes fragmentos poderiam ser encontrados já na solução irradiada, oriundos da fotodegradação do ciclofenil. Além disso, se estes fragmentos foram encontrados no espectro da solução não-irradiada, pode se especular que o mecanismo de formação do fotoproduto é similar ao da formação dos fragmentos no espectrômetro de massa. Assim, pode-se propor o mecanismo de derivação em duas etapas, similar ao padrão de fragmentação do ciclofenil indicado na Figura 15. Uma vez que os dois produtos formados possuem maior rigidez estrutural, isso explicaria o aumento da eficiência quântica dos mesmos em relação à molécula original e por sua vez, o maior sinal fluorescente. Este mecanismo também está de acordo com o perfil de dois patamares observado na curva fluorescência em função do tempo de irradiação do ciclofenil (Figura 15), pois tal comportamento sugere um mecanismo fotoquímico de duas etapas.

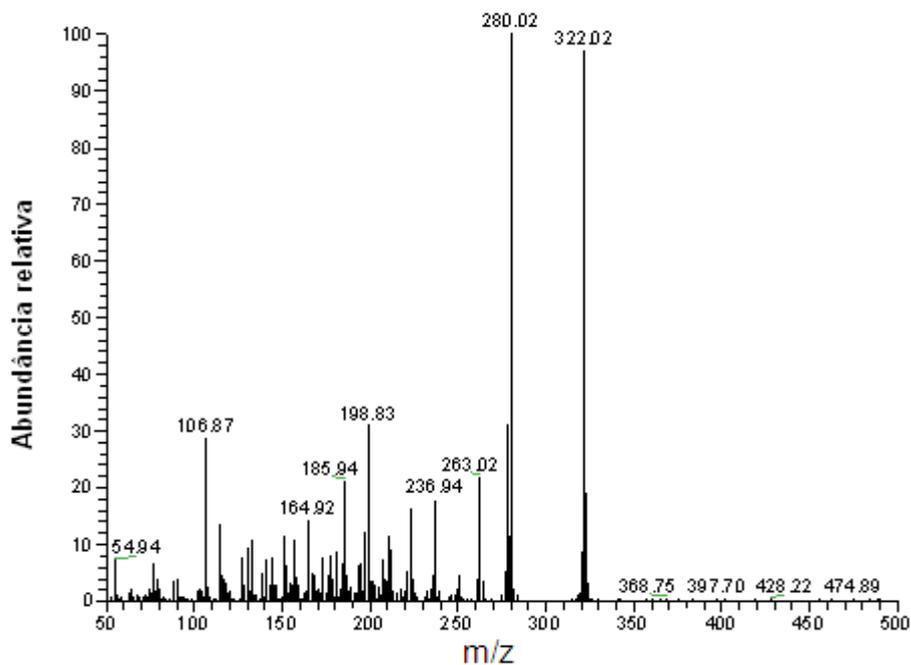


Figura 28 – Espectro de CG-MS para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ciclofenil irradiado (espectro de fragmentação do tempo de retenção de 33,15 min).

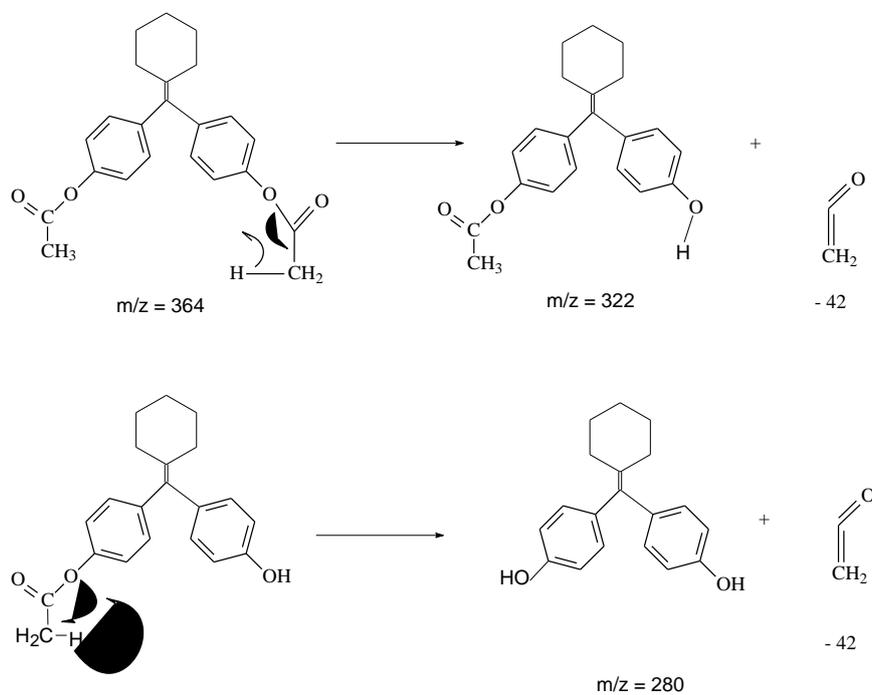


Figura 29 – Mecanismo sugerido para a formação do fotoproduto do ciclofenil

Experimentos adicionais foram feitos utilizando a técnica de espectrometria de massa de Ionização/Dessorção a Laser detectado por tempo de voo, (LDI-TOF/MS). Nesta técnica, a solução do ciclofenil não-irradiada foi submetida a pulsos laser de 337 nm (laser de nitrogênio) para ionizar e vaporizar a amostra para que posteriormente o íon do ciclofenil e fragmentos sejam detectados no espectrômetro de tempo-de-voo por causa da migração forçada pela diferença de potencial aplicada entre o compartimento de amostra e o detector.

Como resultado do experimento, verificou-se a formação dos fragmentos com m/z iguais a 332 e 280 Da, como decorrência da interação da radiação UV do laser (337 nm) com o ciclofenil (Figura 28). Este resultado corrobora a proposta de formação dos fotoprodutos indicados na (Figura 29).

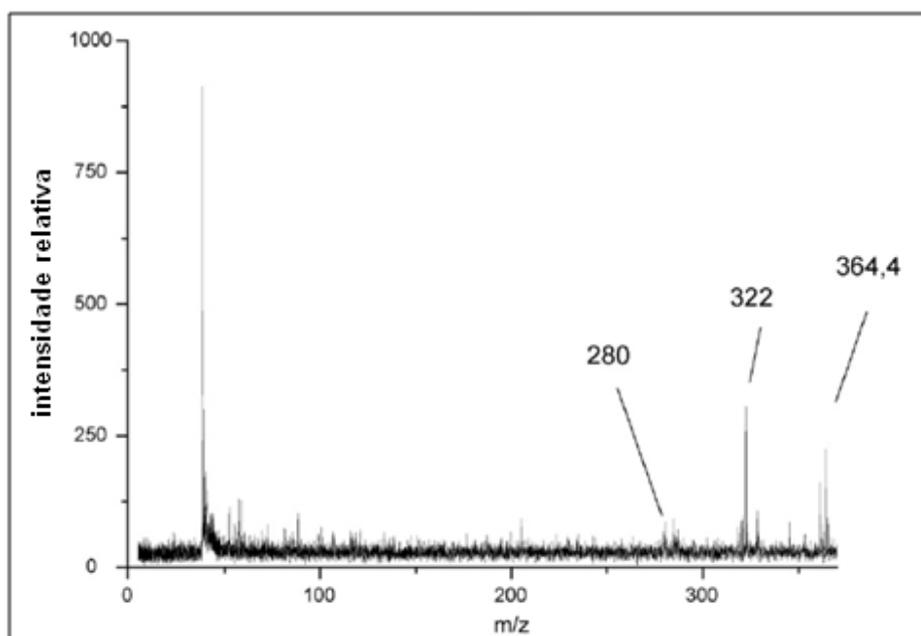


Figura 30 – Espectro de massa do ciclofenil obtido por MALDI-TOF/MS

4.5. Estudos de estabilidade do fotoproduto para determinações espectrofluorimétricas.

Testes foram realizados para monitorar a estabilidade do sinal fluorescente após fotoderivação do ciclofenil. A fluorescência foi medida logo após a fotoderivatização, em intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas, e após uma semana da fotoderivatização. A solução foi preservada geladeira e medida na temperatura ambiente. Durante este intervalo de medida o sinal não oscilou mais que 5% indicando a estabilidade do sistema.

4.6. Linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação.

Após a otimização das melhores condições experimentais para a determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil através do seu fotoproduto, realizou-se um estudo para se encontrar alguns parâmetros analíticos de mérito relevantes do método. Para tal, curvas analíticas foram construídas para se estabelecer esses parâmetros analíticos de mérito. Uma curva típica é representada na Figura 31. A curva analítica foi construída com os valores médios de três medições para cada concentração do ciclofenil após fotoderivatização. A melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada através do método dos mínimos quadrados.

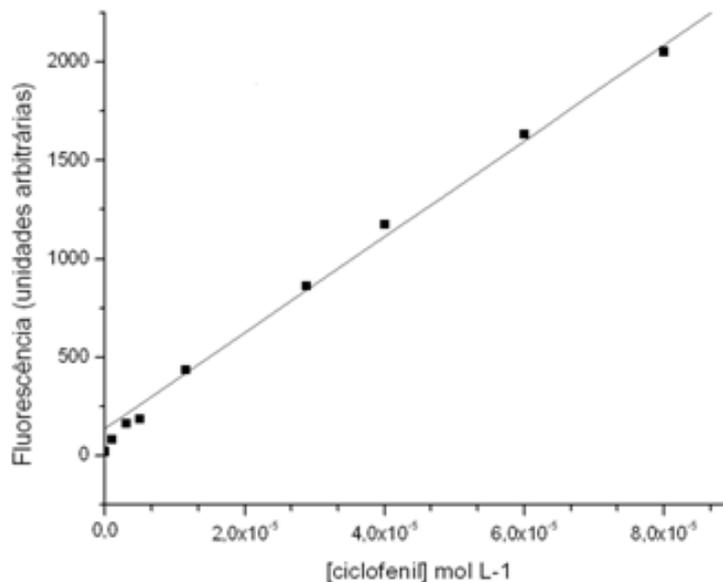


Figura 31 – Curva analítica para a determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil após fotoderivatização.

4.6.1. Linearidade

O INMETRO⁷¹ define a linearidade de um método como “a habilidade do analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração.” A linearidade pode ser obtida tanto por padronização interna quanto por padronização externa, mas em ambos os casos, a relação entre o sinal analítico e a concentração da espécie será regida pela seguinte relação matemática:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$$

Onde β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo⁷² (coeficiente linear e angular, respectivamente) e ε é o erro aleatório associado a determinação de y . Sendo x a concentração (ou massa) do analito e y o sinal analítico. Como conceitualmente não se pode determinar estes parâmetros, apenas estima-los, a equação da reta costuma ser representada por:

$$Y = ax + b$$

Sendo “a” o coeficiente angular da reta, “x” a concentração do analito e “b” o coeficiente linear da reta. A melhor forma de se obter esta relação é através do método dos mínimos quadrados⁷³. No método dos mínimos quadrados os valores de “a” e “b” são estimados minimizando a soma quadrática dos resíduos (diferença entre os valores observados e os previstos pela equação da reta).

A linearidade pode ser avaliada através do coeficiente de correlação linear (r) e do coeficiente de determinação (R^2). O INMETRO⁷¹ recomenda valor maior que 0,90 para o coeficiente de correlação linear. Além disso, a linearidade pode também ser avaliada pelos testes *t* de Student, a prova F de Fischer e o intervalo de confiança.

O teste F é baseado na análise de variância, onde a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) é dividida pela média quadrática do resíduo (MQ_{res}), para seus respectivos graus de liberdade.

$$F = MQ_{reg}/MQ_{res} \quad \text{Equação 14}$$

O resultado encontrado é comparado com o tabelado para o teste F considerando seus graus de liberdade (gl). Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{calc.} > F_{critico}$) indica a não existência de relação linear entre os resíduos e a regressão, ou seja, existe regressão linear entre a concentração e o sinal analítico. Outra forma de avaliar a linearidade do modelo é através do teste *t* de Student. Neste teste, a hipótese nula (H_0) é a hipótese de que a intensidade de sinal analítico (fluorescência, para o caso em questão) e a concentração do analito não se relacionam linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de *t* comprovaria ou rejeitaria esta hipótese.

A Tabela 5 apresenta o resultado da ANOVA feita com os dados utilizados para a construção da curva analítica, por essa tabela pode-se verificar que o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{critico}$, o que é um indicativo de linearidade para este modelo. Outro indicativo de linearidade é o valor do $t_{calculado}$, superior ao $t_{critico}$ ($t_{0,05,8} = 2,3960$). O que rejeita a hipótese nula de não linearidade entre concentração e sinal fluorescente.

Tabela 5 – Resultado da análise de variância para os dados utilizados na construção da curva analítica

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F crítico</i>
Regressão	1	4382924	4382924	1472,9778	2,1217E-09
Resíduo	7	20828,87	2975,554		
Total	8	4403753			

Tabela 6 – Resumo dos resultados da regressão linear

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>
<i>Coefficiente angular</i>	$2,54 \times 10^7 \pm 1,57 \times 10^6$
<i>Coefficiente linear</i>	$86,0 \pm 58,7$
<i>r múltiplo</i>	0,9976
<i>R-Quadrado</i>	0,9952
<i>R-quadrado ajustado</i>	0,9945
<i>Erro padrão</i>	54,54
<i>Observações</i>	9

A Tabela 6 apresenta o resumo dos resultados gerados pela regressão linear. Nela pode-se ver que, também pelo critério do coeficiente de relação (R) e pelo coeficiente de determinação (r^2) a faixa escolhida apresenta comportamento linear.

Por essa tabela é possível também obter os parâmetros para a reta com um limite de confiança de 95%. O coeficiente angular (a) foi de $2,54 \times 10^7 \pm 1,57 \times 10^6$ e o coeficiente linear (b) foi $85,95 \pm 58,70,57$. O erro padrão foi de 54,54. Um estudo adicional indicou um comportamento homoscedástico para a curva.

4.6.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Muita controvérsia existe sobre a melhor forma de definir o valor do limite de detecção (LD), alguns autores trazem esta definição como : “o menor valor que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado”, outras definições, como a usada pelo INMETRO⁷¹, dizem que o LD é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

O limite de quantificação (LQ) pode ser considerado como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão. Diferentes definições afirmam que o LD pode ser considerado como o

menor valor do analito que irá gerar um sinal correspondente a 5, 6 ou 10 desvio padrão do branco. Neste trabalho, o critério utilizado para calcular o LD e LQ foi o critério de $3s_b/a$ para o LD, e $10s_b/a$ para LQ, sendo s_b o desvio padrão de 7 leituras do branco, e “a” o coeficiente angular da reta. Segundo estes critérios, o valor de (LD) foi de $5,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e o (LQ) apresentou valor de $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.6.3. Precisão (repetitividade)

A precisão oferece uma estimativa da dispersão dos resultados obtidos de uma mesma amostra sob condições definidas, normalmente, estes resultados são expressos através da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste trabalho, foi obtida a repetitividade e a precisão intermediária.

O VIM (vocabulário internacional de metrologia)⁷⁴ defini a repetitividade como: “o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições. Para calcular a repetitividade, foram feitas sete medições de fluorescência de duas soluções de ciclofenil de concentrações distintas ($3,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), e o resultado expresso na forma de desvio padrão relativo. O resultado encontrado foi de 3,3% e 1,9% respectivamente.

Um segundo estudo de repetitividade foi realizado usando sete soluções de ciclofenil (na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), que foram colocadas em tubos de quartzo, cada uma em um tubo, e irradiadas. Esse estudo permitiu verificar o impacto do processo de irradiação na precisão do resultado. Os resultados indicaram desvio padrão relativo de 2,8%.

4.6.4. Precisão (precisão intermediária)

Este parâmetro estima a precisão dos resultados quando um determinado parâmetro é variado, parâmetro este que pode ser: operador, temperatura, dia, etc. Para este trabalho, a precisão intermediária foi obtida realizando sete leituras de uma solução de ciclofenil ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em dois dias diferentes, cada dia por

um operador, e cada operador preparava a sua solução. Desta forma avaliou-se a precisão com troca de dia e de operador. O valor encontrado foi de 3,9%.

4.6.5. Determinação do ciclofenil em formulações farmacêuticas

Para se testar a aplicabilidade do método espectrofluorimétrico para a determinação do ciclofenil, foi feita a determinação deste composto em formulação farmacêutica. Para tal, utilizou-se o medicamento Menopax®. Foram feitas três soluções amostra iguais, que foram analisadas cada uma em um dia diferente. Cada amostra de formulação farmacêutica foi uma alíquota de um mesmo conjunto de comprimidos pulverizados. As determinações foram feitas por método de interpolação em curva analítica, sendo as recuperações percentuais do ciclofenil indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado da determinação do ciclofenil em formulação farmacêutica.

Amostra	Recuperação (%)			Média (%)	Desvio padrão (%)
1	102,4	94,1	99,3	98,6	4,19
2	94,2	93,2	102,4	96,6	5,05
3	103,2	97,4	98,2	99,6	3,14
média				98,3	3,87

Para um intervalo de confiança de 95% o resultado da determinação dos dias (um total de nove determinações) apresentou um resultado de $98,3 \pm 3,9$ %, este resultado foi comparado com o obtido por outra técnica analítica - voltametria adsortiva de redissolução anódica – tabela 8. O resultado da recuperação pelas duas técnicas foi comparado aplicando o teste F e não foi observado nenhuma diferença estatística.

Tabela 8 – Resultado da determinação do ciclofenil em formulação farmacêutica por voltametria adsorptiva de redissolução anódica

Amostra	Recuperação (%)			media	Desvio padrão
1	105,5	99,2	106,5	103,7	3,95
2	94,5	102,7	95,5	97,6	4,47
3	107	96,8	100,7	101,5	3,37

Este resultado é um forte indicativo de que o método proposto pode ser aplicado para a determinação do ciclofenil em formulações farmacêuticas.

Outra forma de calcular a repetitividade do método foi fazendo uma análise de variância dos valores para a recuperação do ciclofenil em diferentes dias, o resultado desta análise está exposto na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultado da análise de variância para as determinações do ciclofenil em diferentes dias.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	14	2	7	0,396601	0,68901	5,1432
Dentro dos grupos	105,9	6	17,65			
Total	119,9	8				

O resultado da Tabela 9 mostra que não houve diferença estatística significativa entre as determinações de ciclofenil realizadas em diferentes dias.

Outro fator avaliado foi a possibilidade de interferência de outras substâncias presentes no comprimido (seletividade). O resultado de recuperação indica não haver nenhum potencial interferente na matriz do medicamento, no entanto, investigações adicionais foram feitas.

Segundo a bula, cada comprimido (massa em torno de 300 mg) contém 200 mg do princípio ativo e o restante da formulação são excipientes (amido de milho, celulose microcristalina, estearato de magnésio, glicolato de amido sódico, polvidona e manitol). Destas substâncias, apenas o manitol é solúvel em metanol e, portanto, o único potencial interferente. Para se verificar o efeito do manitol, os espectros de soluções irradiadas de ciclofenil ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), contendo

diferentes concentrações de manitol (de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ até $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram comparados com o espectro de uma solução contendo apenas ciclofenil irradiado. Em nenhum dos casos foi observada interferência no sinal luminescente do ciclofenil, o que confirma que, pelo menos nas proporções testadas, o manitol não interfere.

4.6.6. Determinação do ciclofenil em urina.

Vários testes foram realizados na tentativa de se determinar o ciclofenil em amostras de urina. Para tal, amostras de urina fortificadas com ciclofenil foram usadas. Sabendo que, ao contrário do plasma sanguíneo, a urina é relativamente livre de proteínas⁷⁵, o primeiro teste foi o de tentar fazer a determinação direta do analito em urina sem nenhum pré-tratamento, apenas com a irradiação UV, necessária para obter o fotoproduto fluorescente. Desta forma, pequenas alíquotas de urina (após serem irradiadas) foram misturadas com tampão e metanol nas condições otimizadas e medidas diretamente. Nestes casos, um sinal fluorescente intenso da matriz urina foi observado na mesma região espectral do fotoproduto do ciclofenil, provocando intensa interferência espectral. Na tentativa de eliminar tal interferência, foi testado um procedimento de limpeza da urina, utilizando sulfato de amônio. O sobrenadante proveniente deste procedimento foi irradiado e em seguida misturado com tampão e metanol nas condições otimizadas. No entanto, a interferência espectral ainda foi observada.

Procedimentos de extração também foram testados para viabilizar a determinação em urina. Primeiramente, amostras de urina, que foram submetidas ao procedimento de limpeza com sulfato de amônia, foram eluídas em cartuchos de fase sólida C-18. Como a maioria dos compostos presentes na urina são hidrossolúveis, enquanto o ciclofenil é um composto de baixa polaridade, o material que passava direto pelas colunas era descartado. Em seguida, as colunas foram lavadas com 2 mL de água e em seguida metanol. Esta solução metanólica foi misturada com tampão e sua fluorescência foi medida. Novamente ainda foi observada a interferência espectral. Alternativamente, um procedimento de extração com solvente foi usado, novamente fundamentado no fato de que a maioria dos compostos presentes na urina é hidrossolúvel, enquanto que o ciclofenil possui maior solubilidade em meio orgânico. Idealmente, o analito deveria ser extraído da urina para um solvente orgânico que depois seria eliminado por evaporação assistida com nitrogênio, recuperando o resíduo em metanol. Inicialmente, o procedimento foi testado com vários solventes orgânicos (clorofórmio, diclorometano e tetra cloreto de carbono) usando uma solução aquosa padrão de ciclofenil. Os melhores resultados foram obtidos com o

diclorometano. Inclusive, ao se comparar o resultado final da fluorescência da solução recuperada com o sinal esperado pela curva analítica, foi observado que não houve nenhuma perda de ciclofenil com este procedimento.

A aplicação desse procedimento em urina exigiu que essas amostras fossem previamente limpas com sulfato de amônio para que se evitasse a formação de emulsão no momento da retomada do resíduo com metanol. Infelizmente, os resultados obtidos com esse procedimento não permitiram a obtenção de medições sem interferência espectral.

Como o método espectrofluorimétrico não apresentou especificidade suficiente para possibilitar a determinação do ciclofenil na urina, fez-se necessário escolher outra abordagem analítica para viabilizar tal tipo de determinação. Fez-se uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência.

4.7. Desenvolvimento do método cromatográfico

4.7.1. Estudos preliminares

Ao decidir trabalhar com HPLC, alguns estudos prévios foram realizados para a escolha de solventes, comprimento de onda de emissão e de excitação, fase móvel, colunas, etc. Claro que, alguns destes parâmetros foram aproveitados do desenvolvimento da metodologia para a determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil. Entretanto, uma modificação foi feita em relação à melhor condição obtida para método espectrofluorimétrico. Como o pH 10,8 em questão é prejudicial para a grande maioria das colunas cromatográficas e o uso de tampão aumenta a frequência de manutenção do instrumento, escolheu-se trabalhar apenas com o ciclofenil irradiado em meio sem tampão. Essa escolha foi considerada razoável, pois o parâmetro fotoquímico que exerce maior influência no processo é o tempo de irradiação com UV, desta forma, o comprimento de onda escolhido foi o observado como o melhor para o ciclofenil irradiado em meio 100% metanol (305/400 nm).

Para dar continuidade ao desenvolvimento do método cromatográfico para determinação do ciclofenil em urina, primeiramente foram realizado alguns estudos em padrões para se obter as condições de sistema para a separação do analito dos componentes da mistura. Sendo o ciclofenil (na sua forma original) um composto de baixa polaridade, os estudos iniciais foram realizados utilizando condições típicas para cromatografia de fase reversa em coluna C-18. Como o analito é solúvel em metanol, foi escolhido o metanol/água como sistema inicial de eluição.

Uma das primeiras coisas observadas ao se obter um cromatograma preliminar para a solução irradiada de ciclofenil foi a observação de mais de um pico. Este comportamento já era esperado, uma vez que a radiação UV possui como característica fragmentar a molécula original, confirmando algumas das observações do mecanismo sugerido. Assim, a primeira preocupação foi a de obter condições que permitam a separação dos picos provenientes da fotoderivação do ciclofenil, para depois selecionar um com características propícias para a determinação indireta do analito original.

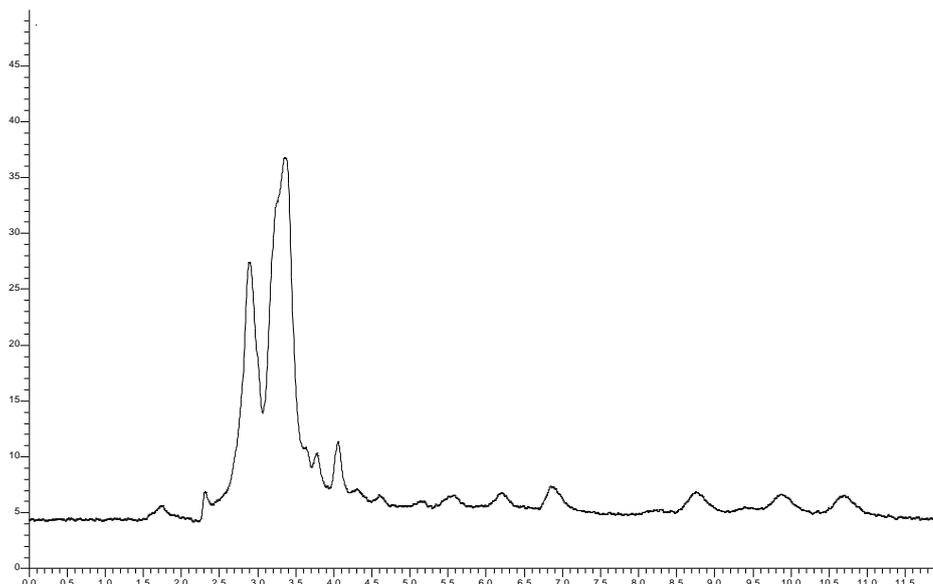


Figura 32 – Cromatograma obtido para uma injeção de 20 μL de uma solução de ciclofenil $1,00 \times 10^{-4}$, usando eluição isocrática com metanol/água 80/20% v/v e coluna C-18 de 15 cm de comprimento.

O cromatograma da Figura 32 foi registrado utilizando um sistema de eluição isocrática, o que claramente se mostrou insuficiente para completa resolução dos picos. A próxima etapa do trabalho passou a ser a de encontrar a melhor condição para separar estes picos. No entanto, na separação destes picos nas soluções padrões de ciclofenil só seria aceita como condição final de trabalho, se levada em consideração os efeitos de matriz, ou seja, a presença e a característica cromatográfica dos componentes da urina que apresentam propriedades fluorescentes no mesmo comprimento de onda que os picos do ciclofenil após derivatização. Para tal, a busca da melhor condição cromatográfica foi realizada nas amostras de urina enriquecidas, que por sua vez foram, previamente à fotoderivação, eluídas em cartucho C-18 para a minimização das potenciais interferências.

Com relação aos tipos de solventes usados como fase móvel (metanol e acetonitrila), não foi observado nenhuma diferença no cromatograma do composto. Assim optou-se pelo uso do metanol. A coluna utilizada foi a C-18 de 25 cm por 4,6 mm, com $5\mu\text{m}$ de tamanho médio de partícula. A melhor condição de eluição utilizando esta coluna foi com o gradiente de eluição iniciado com metanol/água 60/40% v/v, aumentando a proporção de metanol para 100% em

cinco minutos. A Tabela 10 apresenta as condições instrumentais otimizadas para a determinação do ciclofenil e a Figura 33 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 10 – Condições instrumentais otimizadas para determinação de ciclofenil por HPLC/F

Coluna	C-18 ODS de 25 cm de altura e 4,6 mm de diâmetro, 5 μm de tamanho médio de poro
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Metanol/água	1 ^a etapa: 40% água e 60% de metanol; 2 ^a etapa: Variação para 100% de metanol em 5 minutos Step 3; 3 ^a etapa: Manutenção neste valor por 10 minutos.

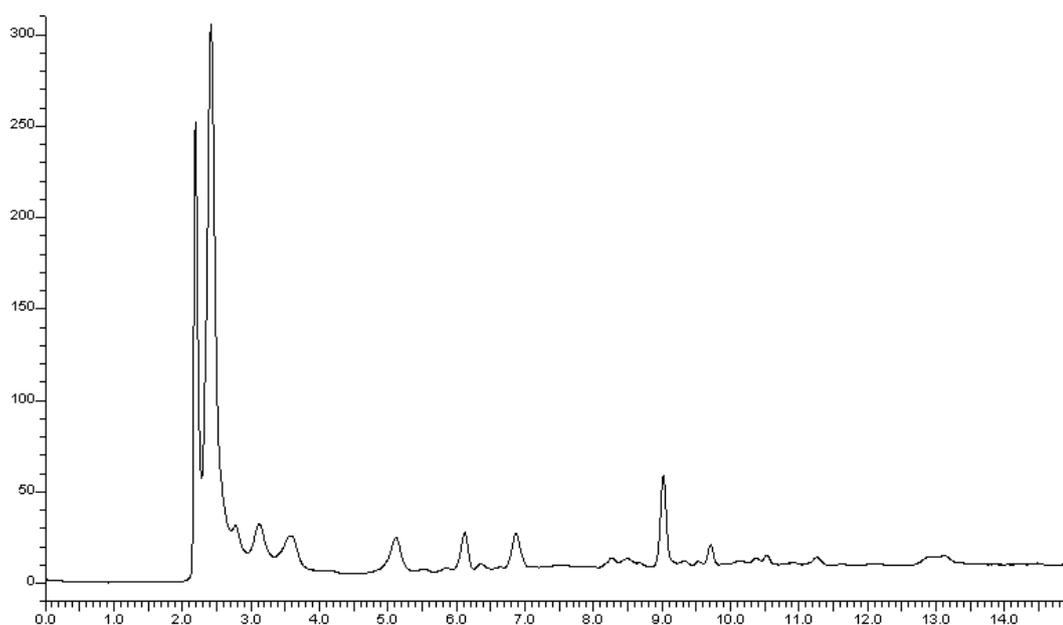


Figura 33 – Cromatograma obtido com injeção de 20 μL de uma solução de urina enriquecida ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) com ciclofenil.

4.7.2. Interferência de matriz na urina.

Nas condições cromatográficas utilizadas, não foi observado interferência espectral no pico fluorescente no tempo de retenção de 6 min. No entanto, foi

observada baixa recuperação do ciclofenil nas amostras enriquecidas de urina (65% do valor esperado). Provavelmente parte do ciclofenil se combinou com algum concomitante hidrossolúvel da matriz (ou mesmo algum anfifílico) de forma a ser eliminado na eluição junto com a matriz.

Na tentativa de contornar este inconveniente, alguns testes foram realizados. O primeiro consistiu em averiguar a necessidade de se utilizar o cartucho C-18 previamente à injeção no cromatógrafo. Nesses testes, amostras de urina enriquecida foram diretamente diluídas em metanol. Outro teste consistia em realizar o procedimento de extração líquido-líquido (utilizando diversos solventes, como metanol, diclorometano, n-hexano). Em nenhuma das tentativas obteve-se sucesso. Testou-se também aumentar a eficiência da eluição no cartucho C-18 (com maior volume de eluente, e também eluentes mais fortes), mas não houve alteração no valor da recuperação.

Para contornar o problema de falta de exatidão da determinação por perda de analito durante a eluição, foi utilizada a técnica de adição de analito. Utilizando este procedimento foram obtidas recuperações de: $98 \pm 5\%$. No entanto, este método ainda foi considerado muito trabalhoso, e mais uma última tentativa ainda foi executada, a utilização de um padrão interno.

4.7.3. Calibração com padrão interno.

O padrão interno é uma espécie química, cujas características estruturais devem ser similares ao do analito e que ao ser adicionado aos padrões de calibração e às amostras em concentrações conhecidas e constantes, facilita a determinação do analito por compensar variações e perdas ocorridas nas etapas de pré-tratamento e perdas por causa da matriz da urina. Se o padrão interno sofrer as mesmas perdas que o analito, a razão entre as características do analito e do padrão interno (por exemplo, a área do pico) garantem maior precisão e exatidão na detecção do analito por procedimentos de calibração simples como a interpolação de curvas de calibração.

Neste trabalho, para escolher o padrão interno, buscou-se um composto que apresentava uma estrutura parecida com parte da estrutura do ciclofenil ou de seus

fragmentos, assim, escolheu-se o acetato de m-toluil (3-metil-fenil acetato) (Figura 34).

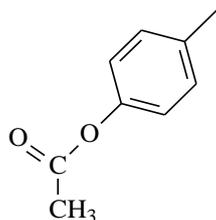
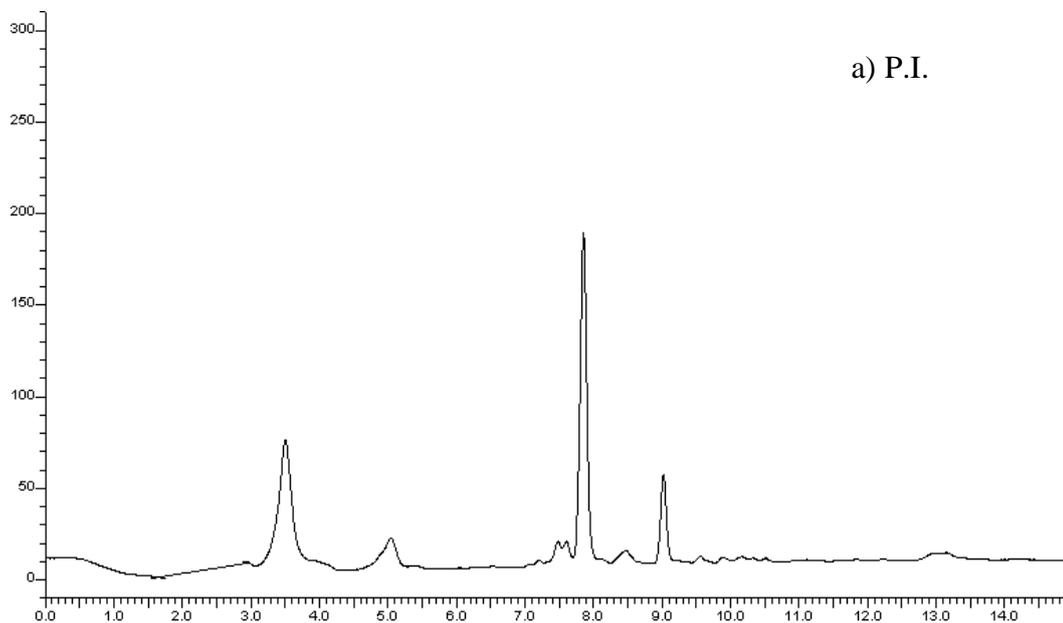
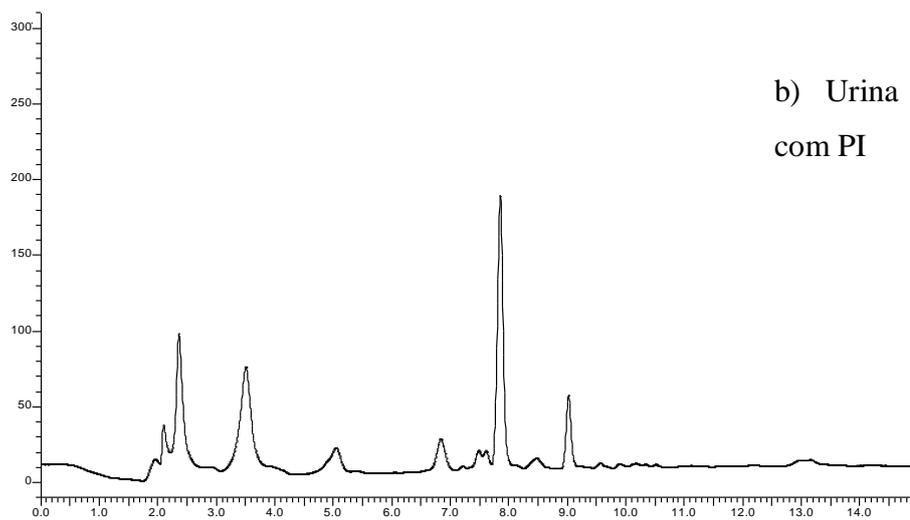


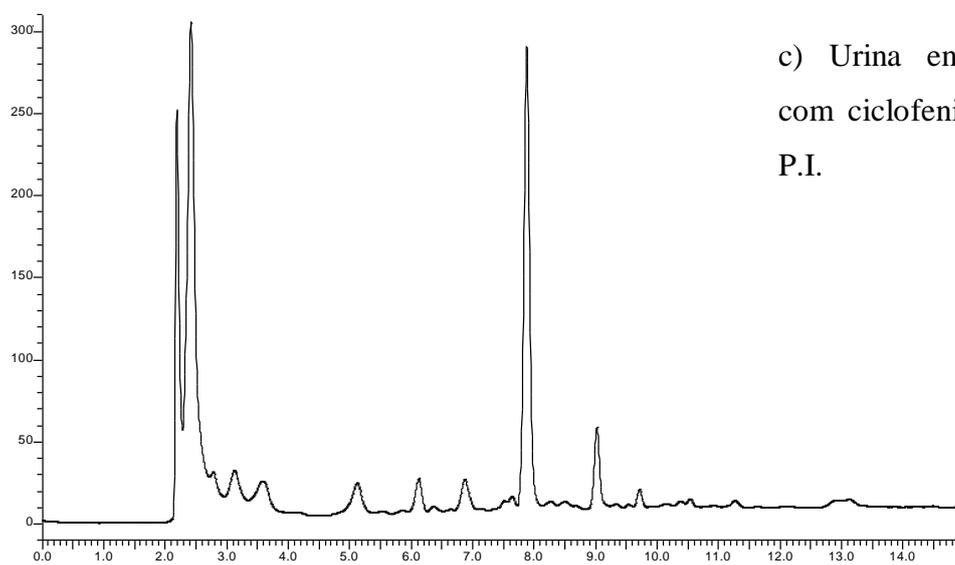
Figura 34 – Estrutura química do acetato de m-toluil

Antes de se testar este composto em uma curva analítica, foram feitos alguns testes para verificar a viabilidade de sua utilização. Para se realizar estes testes, preparou-se soluções de ciclofenil irradiado, acetato de m-toluil irradiado, e solução contendo os dois. Foi observado que o composto possuía características satisfatórias para sua utilização cromatográfica nas condições otimizadas para o ciclofenil.





b) Urina enriquecida
com PI



c) Urina enriquecida
com ciclofenil, e com
P.I.

Figura 35 – Cromatogramas de: a) Branco, b) Padrão Interno irradiado, c) Ciclofenil irradiado.

4.7.4.

Seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação

Segundo a IUPAC⁷⁶, a seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Não faz sentido pensar em nenhum outro parâmetro, como faixa linear ou sensibilidade, antes de se assegurar a seletividade do método. Para avaliar a seletividade deste método, foi comparado o cromatograma obtido por uma análise em branco (urina), e a comparação do resultado de recuperação oriundo de uma urina enriquecida.

Como as condições instrumentais foram otimizadas de modo que na região aonde sai o fragmento utilizado para quantificar o ciclofenil, ou mesmo o pico utilizado do padrão interno, nenhum pico dos componentes da urina surgiu.

A curva analítica obtida para o método cromatográfico usando padronização interna está representada na Figura 36. Cada ponto da curva é resultado de três medições de sinal (área) do pico do derivado do ciclofenil em 6 min de tempo de retenção.

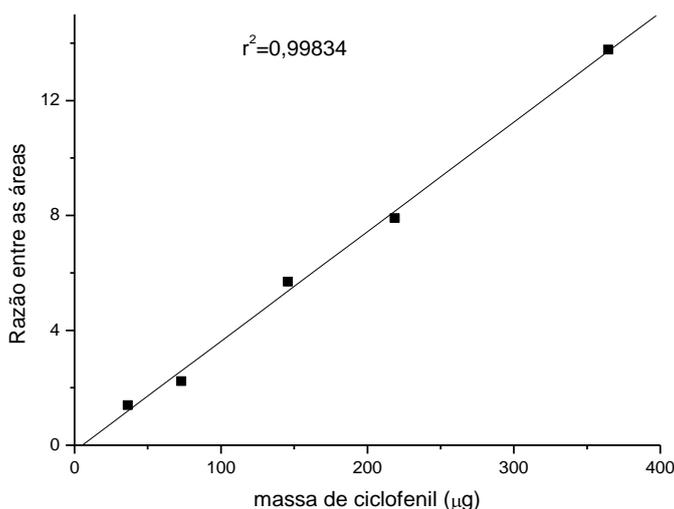


Figura 36 – Curva analítica com padronização interna para o ciclofenil irradiado.

A Tabela 11 apresenta o resultado da análise de variância dos dados utilizados para se construir a curva analítica. Por estes valores, pode-se ver que, segundo o critério do teste F, há linearidade para este conjunto de dados.

Tabela 11 – Resultado da análise de variância dos dados utilizados para a construção da curva analítica

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F critico</i>
Regressão	1	130,9503	130,9503	1471,276	12,22
Resíduo	4	0,356018	0,0890046		
Total	5	131,3064			

A Tabela 12 apresenta o resumo dos resultados obtidos da regressão linear. Por essa tabela pode-se ver que também pelos critérios de coeficiente de detecção e coeficiente de correlação, existe linearidade no modelo.

Tabela 12 – Resultados da regressão linear

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>
<i>Coef angular</i>	$0,03785 \pm 0,00274$
<i>Coef Linear</i>	$-0,1211 \pm 0,5107$
R múltiplo	0,9986
R-Quadrado	0,99728
R-quadrado ajustado	0,99661
Erro padrão	0,298336
Observações	6

A equação de reta para este modelo, para um limite de confiança de 95%, pode ser descrito como $y = 0,038x$.

Com base nas definições adotadas e nos resultados obtidos, o valor de LD e LQ foram respectivamente $3,72 \times 10^{-7}$ e $1,24 \times 10^{-6}$ g para 20 μ L de volume de amostra, sendo que a faixa linear de trabalho se estendeu até 364 μ g.

Para calcular a repetitividade, foram feitas sete análises cromatográficas de uma mesma solução de ciclofenil ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), e o resultado expresso na forma de desvio padrão relativo. O resultado encontrado foi de 2,5% do valor de fluorescência, sendo considerado ótimo, uma vez que este valor é inferior ao

limite de 5%, estabelecido como valor limite para validação de métodos cromatográficos⁷⁷.

Para este trabalho, a precisão intermediária foi obtida realizando sete análises cromatográficas de uma solução de ciclofenil ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em dois dias diferentes, onde cada dia a análise foi feita por um operador (cada operador preparando sua própria solução). Desta forma avaliou-se a precisão com troca de dia e de operador. O valor encontrado foi de 4,2%.

4.7.5.

Aplicação do método cromatográfico para determinação do ciclofenil em urina enriquecida

Para se testar a aplicabilidade do método cromatográfico para a determinação do ciclofenil em urina, a determinação deste composto foi feita em amostras fortificadas. Para tal, foram preparadas, em cada dia, duas soluções de urina enriquecidas com analito e padrão interno em diferentes níveis de concentrações e determinadas por interpolação com a curva de calibração. As recuperações percentuais do ciclofenil estão indicadas na Tabela 13, onde por um teste t-Student, pode-se verificar que não há diferença estatística entre as recuperações (95% de confiança)

Tabela 13 – Resultados das recuperações obtidas em dois níveis diferentes de concentração, em dias diferentes.

Nível de fortificação (mol L⁻¹)	Dia	Recuperação (%)	Média (%)	RSD (%)
5,0 x 10 ⁻⁶	1	95	98,3	3,6
	2	104		
	3	98		
5,0 x 10 ⁻⁵	1	98	99,7	2,9
	2	99		
	3	103		