

4 Fosforescência

A luminescência estimulada pela absorção de radiação é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e fosforescência. O fenômeno luminescente é definido como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível de energia excitado para outro nível de menor energia, isto é decorrente da interação entre a matéria com a radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta. A diferença entre fluorescência e fosforescência se dá pelo tipo de transição eletrônica radiativa responsável pela desativação do estado excitado. A fosforescência ocorre quando moléculas excitadas no estado tripleto retornam para o estado fundamental emitindo radiação^{66,67}.

Os estados excitados moleculares de onde se originam os fenômenos fotoluminescentes são classificados de acordo com a orientação de spin do elétron promovido. Quando a direção do spin do elétron que é promovido para um orbital de maior energia é preservada, tem-se o estado excitado singleto. No estado excitado tripleto o spin do elétron promovido é invertido, como representado na Figura 39. No processo fosforescente a direção do spin do elétron da espécie molecular no estado excitado sofre uma inversão (mudança de multiplicidade do estado excitado de singleto para tripleto), assim a emissão de radiação ocorre com um tempo de vida da ordem de 10^{-4} a 10^1 s, significativamente maior que o da fluorescência (10^{-7} - 10^{-9} s). Adicionalmente, as energias dos estados excitados tripletos são relativamente menores que a dos seus equivalentes singletos, conseqüentemente, a banda de emissão fosforescente ocorre em região espectral de menor energia (comprimento de onda maior)^{67,68}.

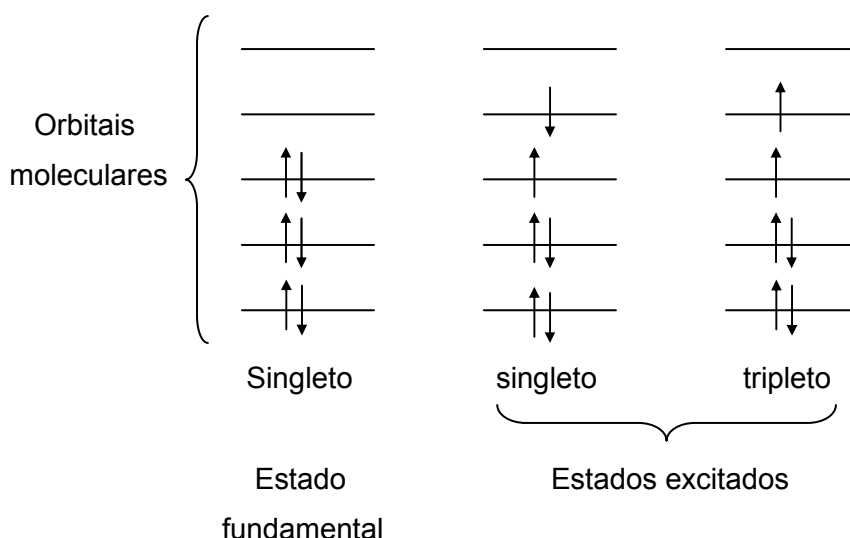


Figura 39: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais moleculares para o estado fundamental, e para os estados excitados singleto e tripleto.

O estado fundamental é singleto e denominado S_0 . Já os estados excitados singleto e tripleto de menor energia são chamados de S_1 e T_1 , respectivamente, sendo que, normalmente, o estado T_1 possui menor energia que S_1 . Em geral, simultaneamente a uma transição eletrônica, ocorrem também mudanças nos estados vibracionais e rotacionais da molécula. Assim, ao se considerar que uma população de moléculas esteja envolvida no processo, as bandas espectrais são relativamente largas ($\Delta\lambda$ na ordem de 100 nm), pois vários níveis rotacionais e vibracionais diferentes estão disponíveis em energias ligeiramente diferentes^{66,67,68}.

O diagrama de Jablonski (Figura 40) pode ser usado para compreender os processos fotoluminescentes. A partir da absorção de fótons de energia apropriada, uma população de moléculas pode passar do estado fundamental (S_0) para qualquer dos estados vibracionais de um estado excitado singleto (S_n). Por meio de uma série de relaxamentos vibracionais (RV), essa população excitada é levada através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade, até atingir o primeiro nível vibracional do primeiro estado excitado singleto (S_1) - regra de Kasha. O RV ocorre na escala de tempo da ordem de 10^{-13} a 10^{-11} s. Essa transição, que não envolve emissão de radiação, pode também ocorrer pela transferência de energia vibracional para outras moléculas (solvente, por exemplo) através de colisões. O efeito final é a conversão de parte da energia do fóton absorvido em calor, que é disseminado por todo o meio⁶⁰.

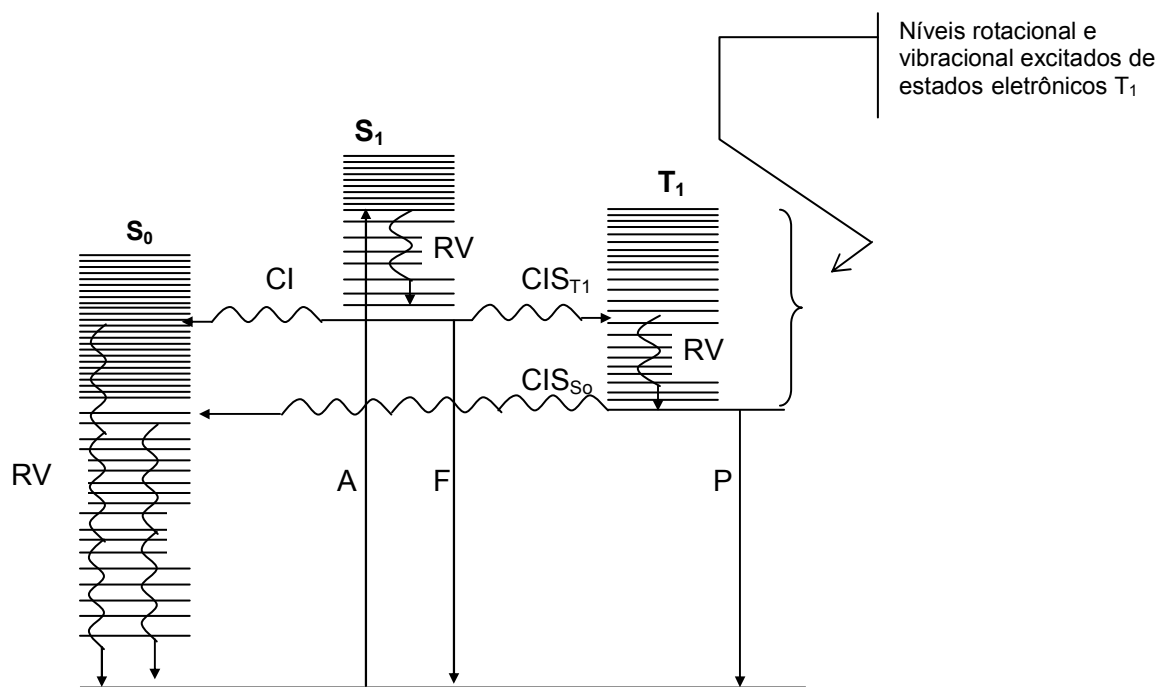


Figura 40: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Vo-Dinh, John Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), cruzamento interno (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS), fosforescência (P), estado fundamental (S_0), estado excitado singlete (S_1) e estado excitado tripleto (T_1).

A partir de S_1 , a população de moléculas pode retornar para o S_0 por uma combinação de etapas envolvendo processos radiativos (fluorescência e fosforescência) e/ou não-radiativos (relaxamento vibracional e cruzamento interno). O cruzamento interno (CI) ocorre quando a população passa para níveis vibracionais de S_0 que possuem energia mais elevada, semelhante ao do nível vibracional de menor energia de S_1 , esse processo ocorre em intervalos de tempo similares ao do relaxamento vibracional. O relaxamento vibracional ocorre se a diferença de energia entre S_1 e S_0 não for muito grande e existir sobreposição de níveis vibracionais. No caso da fluorescência (F), a desativação a S_0 por emissão de fóton ocorre se a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande e as condições do meio favorável. Se houver possibilidade de acoplamento spin-orbital, a transição eletrônica entre estados excitados de diferente multiplicidade ($S_1 \rightarrow T_1$) deve acontecer no processo denominado de cruzamento intersistemas – CIS. Nesse caso, a molécula pode se desativar, a partir de T_1 , por meio de relaxamento vibracional ou por meio de fosforescência (P), com emissão de fótons. O CI e a fluorescência competem muito

eficientemente pela desativação do estado excitado, por isso, a fosforescência é observada somente em condições especiais^{60,69}.

O CIS é um processo não-radiativo fundamental para a observação de fosforescência e que envolve a troca de multiplicidade da população no estado excitado. O CIS tem duração na ordem de 10^{-7} s e compete com a fluorescência e com o CI. Embora a transição de estados excitados de diferentes multiplicidades seja quantomecanicamente proibida, o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital. Este tipo de fenômeno, que consiste no acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e pelo movimento angular do orbital do elétron, promove a mistura quantomecânica de estados excitados⁶⁶.

As taxas relativas de CI, relaxamento vibracional, CIS, fluorescência e fosforescência são dependentes da estrutura da molécula, do sistema de solventes ou substrato, da presença de espécies químicas concomitantes e de condições como a temperatura e a pressão. Pode-se observar na Figura 40, que a energia da fosforescência é menor do que a energia da fluorescência, de forma que as bandas de emissão fosforescentes aparecem em comprimentos de onda maiores (energias menores) do que as bandas de emissão fluorescente⁶⁰.

O uso da fosforescência em química analítica (fosforimetria) é bem menos comum que o da fluorescência, pois se requer condições especiais para aumentar a eficiência da transição radiativa entre estados de diferentes multiplicidades. Os primeiros estudos com fosforimetria foram realizados em baixas temperaturas (usando nitrogênio líquido) e solventes apropriados para a criogenia. No entanto, a evolução da técnica mostrou que os sinais fosforescentes podiam ser obtidos em temperatura ambiente, pela adsorção do fósforo em uma matriz sólida, em solução com meio organizado, ou mesmo diretamente em solução aquosa⁶⁷. Desde então, muitos grupos de pesquisa se dedicaram na viabilização da fosforimetria como técnica analítica de rotina, valorizando sua seletividade e sensibilidade, decorrente de um ambiente espectral potencialmente de baixo sinal de fundo.

A eficiência quântica luminescente (ϕ_L) é um parâmetro que avalia a contribuição do processo radiativo no processo geral da desativação da molécula no estado excitado. A eficiência quântica fosforescente é expressa pela razão entre o número total de fótons emitidos pela molécula na forma fosforescente e o número total de fótons absorvidos no estado excitado singleto. A fosforescência é uma característica intrínseca do composto e depende de certas condições experimentais (temperatura, solvente, rigidez da matriz do analito). A Equação

26 descreve a eficiência quântica da fosforescência (ϕ_P) em termos de constantes de velocidades de todos os processos radiativos e não-radiativos de desativação de uma molécula excitada^{66,67,70}.

$$\phi_P = \left(\frac{k_P}{k_P + K_m} \right) \left(\frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{IC}} \right) \quad (26)$$

onde:

$$\phi_{cis} = \frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{fq}} \quad (27)$$

onde:

k_P – Constante de velocidade da fosforescência

K_m e k_{fq} – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de T_1

k_{CIS} – Constante de velocidade do cruzamento intersistemas

k_f – Constante de velocidade da fluorescência

k_{IC} – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de S_1

Os valores de ϕ_P podem assumir valores entre zero e um, assim compostos com ϕ_P próximos da unidade certamente apresentarão alta probabilidade de desativação de T_1 através de emissão fosforescente⁷¹.

Conforme já foi mencionado, moléculas no estado T_1 possuem grande probabilidade de se desativar para S_0 por processos não-radiativos, por isso, para aumentar a chance de uma molécula fosforescer, se faz necessário minimizar a probabilidade dos processos não-radiativos ocorrerem. Pela Equação 26 pode-se ver que a eficiência da fosforescência é favorecida tanto pela redução do valor de K_m quanto pelo aumento de k_{CIS} .

A redução do valor de K_m pode ser alcançada pela redução de liberdade vibracional e de difusão do luminóforo (molécula luminescente) colocando-se em uma matriz rígida ou organizada. Nesse caso, soluções congeladas a 77K, solventes viscosos, meio organizado ou substratos sólidos são artifícios que podem ser aplicados^{66,67,71}.

No caso do ϕ_{cis} , a presença de átomos de elevado número atômico (átomos pesados) nas vizinhanças da molécula de interesse pode provocar um aumento na magnitude desse parâmetro^{66,67,72}. Como consequência, o aumento da fosforescência pode ser provocado pela presença de átomos pesados na

forma de ligantes na molécula de interesse (efeito interno do átomo pesado)⁷³ ou simplesmente pela proximidade entre a molécula de interesse e átomos pesados na forma, por exemplo, de sais inorgânicos (efeito externo do átomo pesado)⁷⁴. Em ambos os casos, um favorecimento das constantes de velocidades dos processos envolvendo troca de spin eletrônico é observado. Esse aumento da fosforescência é acompanhado pela redução da fluorescência.

A minimização das colisões moleculares entre o luminóforo e as moléculas do solvente e a restrição das vibrações moleculares foram primeiramente realizados pelo congelamento da amostra a 77 K. Atualmente, o uso de substratos sólidos ou de meio organizado em solução aquosa (micelas, por exemplo) vem permitindo a observação de fosforescência na temperatura ambiente (RTP).

4.1. Fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP)

O uso de matrizes que proporcionem à molécula a rigidez em sua estrutura (redução da liberdade vibracional) minimiza os processos de desativação não-radiativos do estado tripleto, além de proteger a molécula contra colisões com outras espécies (pela diminuição da difusão de componentes)⁶⁷.

Durante muitos anos, a fosforimetria se baseou na imobilização da substância fotoluminescente em uma matriz vítrea rígida a baixas temperaturas (em geral 77 K). Apesar das muitas vantagens que esta metodologia oferecia (baixos limites de detecção, ampla faixa linear dinâmica nas curvas analíticas e grande seletividade), existia uma grande resistência ao uso desta abordagem devido à necessidade de criostatos, aos transtornos observados no processo de imersão das soluções em N₂ líquido; às limitações a respeito da escolha do solvente e a dificuldade de se obter uma matriz homogênea que pudesse minimizar a reflexão e o espalhamento de radiação durante o congelamento⁶⁷.

A fosforimetria na temperatura ambiente suportada em substrato sólido (SSRTP) surgiu como uma alternativa a técnica fosforimétrica em baixa temperatura. A SSRTP é uma técnica simples (viável para o uso rotineiro), de baixo custo, de boa seletividade e baixos níveis de detecção (análise de traço). Entretanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como, a dificuldade em termos de automatização e a repetitividade relativamente mais alta que a observada em técnicas que utilizam solução.

O uso de substratos sólidos de baixo custo e de fácil preparação facilitou a observação de intensa fosforescência na temperatura ambiente. Graças à sua eficiência na imobilização de moléculas orgânicas, o substrato sólido tem demonstrado uma capacidade impressionante em permitir a observação de fosforescência de várias classes de analitos. Além disso, o substrato sólido é compatível com o uso de diferentes sais de átomos pesados, quando comparado com a outra maneira de se obter RTP: o meio micelar. O uso do meio micelar, na prática, tolera o uso de apenas dois (I^- e de Tl^+) dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente aplicados em fosforimetria. Esses fatos aumentam a versatilidade e a seletividade da aplicação analítica desse fenômeno com substrato sólido⁷¹.

A fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) só foi reconhecida após estudos feitos por Schulman e Walling⁷⁵. Esses autores identificaram o fenômeno da RTP em uma variedade de suportes, incluindo sílica, alumina, papel e asbestos, mostrando que as moléculas do analito adsorvidas no substrato sólido adquirem a rigidez necessária para minimizar os efeitos de desativação colisional e vibracional do estado excitado.

Entre os diversos materiais pesquisados para servir de substrato sólido, a celulose, na forma de papel de filtro ou papel cromatográfico, é o que tem sido mais utilizada. O papel de filtro, quando tratado adequadamente, tem baixo custo e é compatível com a utilização dos mais variados sais de átomos pesados, que são utilizados como indutores e amplificadores de fosforescência. A principal interação, responsável pela imobilização, entre o analito e o grupo hidroxila da celulose foram atribuídos às ligações de hidrogênio⁷⁶. Além disso, os poros da superfície do papel são sítios onde as moléculas do analito podem penetrar e interagir tridimensionalmente com o substrato após a secagem. Na técnica em substrato sólido, a solução do analito é colocada na matriz sólida e, após a secagem do solvente, a fosforescência é medida em atmosfera inerte⁶⁶.

Uma grande desvantagem do uso dos substratos de celulose é sua fosforescência natural, proveniente das ligninas e hemiceluloses do papel (apresentam uma extensa banda de emissão de 400 a 600 nm) que limita a sensibilidade da SSRTP⁷¹. O principal procedimento para diminuir o sinal de fundo⁷⁷ do papel consiste em uma etapa de lavagem com água fervente seguida de uma etapa de exposição à radiação ultravioleta. Esse procedimento, desenvolvido simultaneamente por Campiglia e de Lima⁷⁸ e por McLeese e Dunlap⁷⁹, é capaz de reduzir o sinal de fundo em até 98%. Mais recentemente, Cardoso⁴⁵ adaptou esses procedimentos para reduzir o tempo total do

tratamento de 16 para apenas 4 h, com redução de sinal de fundo semelhante aos obtidos com os procedimentos originais.

Vários fatores experimentais estão relacionados com a indução e maximização da SSRTP, como: oxigênio e umidade no meio; íons de átomo pesado; modificadores de superfície tais como surfactantes; espécies desativadoras; a natureza do solvente e o pH do meio onde o analito é dissolvido. Esses fatores quando não otimizados podem minimizar ou até eliminar o sinal fosforescente. A seguir faz-se uma descrição do efeito dos fatores mais importantes e que devem ser avaliados no desenvolvimento de métodos baseados na SSRTP.

4.2. Parâmetros que afetam o sinal fosforescente

4.2.1. Efeito do oxigênio e da umidade

A interação de espécies químicas presentes no meio fosforescente com as espécies luminescentes pode minimizar ou até mesmo eliminar sua fosforescência. Este fenômeno é denominado de “quenching” (desativação do estado excitado), podendo ser classificado em dois tipos: o estático e o dinâmico. Na desativação estática, interações entre o luminóforo e a espécie desativadora formam um complexo estável no estado fundamental não-luminescente, impedindo a excitação do luminóforo. No processo de desativação dinâmica, a espécie desativadora pode interagir com o luminóforo durante o tempo em que este se encontra no estado excitado, indisponibilizando a fosforescência⁷¹

A presença de oxigênio molecular é um fator importante, pois este provoca a diminuição e até mesmo a eliminação do sinal fosforescente. A umidade no substrato pode aumentar as colisões (atenuação dinâmica) que desativam as moléculas excitadas sem emissão de radiação^{66,67}.

Estudos teóricos mostram que a interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação da molécula excitada para o estado fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$). Esta desativação da molécula excitada é acompanhada pela transição do oxigênio de seu estado tripleto natural para um estado singleto

excitado. Um dos modelos seguidos para descrever este tipo de interação propõe a transferência de carga, por contato, entre o oxigênio e o analito^{66,67}.

Os efeitos dieletérios provocados pela umidade e pelo oxigênio podem ser reduzidos através de secagem prévia do substrato e da purga de nitrogênio seco sobre a superfície do substrato de celulose antes e durante o procedimento de leitura da fosforescência.

O mecanismo de desativação do estado excitado pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer⁶⁶:

$$I / I_0 = 1 + K_Q \tau [Q] \quad (28)$$

onde: I e I_0 são as intensidades luminescentes na ausência e na presença da substância desativadora Q em uma concentração $[Q]$, respectivamente. k_Q é a constante de velocidade do processo de desativação não radiativa do estado excitado e τ é o tempo de vida da fosforescência. Assim, a equação acima nos mostra que, como o tempo de vida da fosforescência é elevado, a influência do oxigênio e da umidade é muito acentuada quando comparado com a fluorescência. Além disso, a diminuição da fosforescência é diretamente proporcional ao aumento da concentração da espécie desativadora⁶⁶.

4.2.2. Efeito do átomo pesado

O efeito do átomo pesado pode ser justificado pelo aumento do fenômeno chamado de acoplamento de spin-orbital, no qual o estado tripleto adquire algumas características de singleto e vice-versa. Esta condição aumenta a taxa do cruzamento intersistemas (CIS) do estado singleto para o estado excitado tripleto, aumentando a probabilidade de ocorrer fosforescência⁸⁰.

O efeito do átomo pesado na luminescência foi primeiramente observado por McClure em 1949, e logo em seguida por Kasha (1952), o qual percebeu que átomos pesados aumentam a velocidade da transição $S \rightarrow T$ ⁸¹. A primeira aplicação de íons de átomo pesado como amplificador do sinal fosforescente foi em 1975, quando White e Seybold testaram o efeito do NaI em diversas substâncias, como o 1-sulfonato naftaleno, 1-naftol e 2-naftol. Intensidades 40 vezes mais fortes foram obtidas quando o NaI foi usado⁸¹. White e Seybold⁸² (1977) fizeram um estudo da influência de íons halogenetos e descreveram que a eficiência do efeito do átomo pesado entre estes ânions segue a seguinte ordem: $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$. Lue-Yen Bower e Winefordner⁸³ (1978) compararam o

efeito de outros sais de átomos pesados de vários hidrocarbonetos poliaromáticos adsorvidos em papel de filtro e concluíram que a intensidade da fosforescência de hidrocarbonetos poliaromáticos aumentava na seguinte ordem de átomo pesado adicionado: $Tl^+ > Ag^+ > Pb^{2+} > Hg^{2+}$.

O aumento do sinal fosforescente por átomos pesados pode ser induzido pela presença destes na forma de ligantes (efeito interno do átomo pesado)²⁴ ou por sais inorgânicos de átomos pesados adicionados à matriz do analito (efeito externo do átomo pesado). No entanto, a presença de átomos pesados também pode aumentar as constantes de velocidade dos processos de desativação de T_1 sem emissão de radiação. Nestes casos, a eficiência quântica da fosforescência (ϕ_p) será desfavorecida e uma redução no sinal fosforescente será observada^{66,67,71}.

O aumento de sinal devido a presença de átomo pesado é difícil de ser previsto, é necessário um estudo sistemático para verificar qual tipo irá favorecer a fosforescência. Os átomos pesados mais utilizados são iodo, tálio, chumbo, prata, cádmio e mercúrio^{84,82,85,86}.

4.2.3.

Efeito do surfactante como modificador de superfície

A adição de um surfactante, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido, pode produzir um grande aumento de sinal fosforescente, pois a longa cadeia alquílica do ânion do surfactante pode proteger o analito contra fotodecomposição causada pela fonte de irradiação durante as medições espectrais. Além disso, o surfactante na superfície do papel pode organizar as moléculas do analito, aumentando a quantidade de sítios ativos e a rigidez da molécula, e aproximando-as mais dos íons de metais pesados. Esse maior contato entre o analito e os íons de átomo pesado aumenta a probabilidade de acoplamento spin-orbital. O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem nos poros da celulose, facilitando a interação destas moléculas com a superfície do papel. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessiva, o sinal tende a cair por causa, por exemplo, da dificuldade de interação entre o átomo pesado e a radiação incidente (efeito filtro)^{87,88}.

4.2.4. Influência do pH

O pH da solução a ser depositada no papel é um fator muito importante para a obtenção de um bom sinal fosforescente. Von Wandruszka e Hurtubise³⁴ primeiro notaram que a RTP do ácido p-aminobenzóico adsorvido em acetato de sódio diminuía muito em meios extremamente ácidos ou básicos. De Lima e M. Nicola⁸⁹ em seus estudos com diversas substâncias orgânicas depositadas em papel de filtro, concluíram que cada composto em particular tem o seu melhor pH, cujo sinal fosforescente será máximo.

Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior eficiência quântica luminescente. Além disso, espécies com cargas têm maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de que espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel⁶⁷.

O efeito do pH na intensidade fosforescente é largamente dependente da molécula analisada, sendo a escolha do pH muito importante para melhorar a sensibilidade da SS RTP⁷⁰.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Características fosforescentes da enrofloxacin

Sabendo-se que a capacidade fotoluminescente de um composto não depende só de sua estrutura molecular mas também de todo o meio que o cerca, o desenvolvimento de uma metodologia baseada em fosforimetria na temperatura ambiente (RTP) para a determinação de um composto, deve necessariamente começar com o estudo das condições experimentais que afetam as características fosforescentes dos analitos de interesse no substrato de escolha. Desse modo, diferentes condições experimentais foram estudadas visando induzir ou amplificar a fosforescência na temperatura ambiente da enrofloxacin. Em todos esses estudos, os parâmetros instrumentais foram fixados como indicado a seguir: tempo de abertura do detector (3 ms), tempo de retardo do detector (3 ms), velocidade de varredura (1500 nm min^{-1}) e bandas espectrais de passagem de excitação e emissão (ambas 10 nm).

4.3.1.1. Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados com o intuito de se encontrar condições de contorno para o desenvolvimento do método fosforimétrico para a enrofloxacin. O primeiro estudo foi a avaliação da influência de quatro diferentes sais de átomos pesados em substrato de papel onde a enrofloxacin foi colocada. As massas dos sais de átomos pesados adicionados no centro dos substratos foram: 333 μg de TlNO_3 (5 μL de solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$), 504 μg de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5 μL de solução $0,50 \text{ mol L}^{-1}$), 166 μg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (5 μL de solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), 271 μg de AgNO_3 (5 μL de solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$). Esses sais de átomos pesados foram usados como recurso para tentar induzir a fosforescência da enrofloxacin já que este analito não apresentou fosforescência quando imobilizadas diretamente nos substratos de papel. A escolha desses sais foi baseada nos resultados obtidos por Nava²² em estudos com outras fluorquinolonas.

Diferentes átomos pesados devem ser testados, pois um composto ou grupo de compostos responde positivamente na presença daqueles átomos pesados específicos que promovem as mudanças adequadas nos níveis de energia de modo a criar um corredor por onde a população molecular troca de multiplicidade (cruzamento intersistemas).

Nesse mesmo estudo preliminar, as soluções de enrofloxacin (5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), preparadas em sistema de solventes com duas composições diferentes, foram também avaliadas. As composições das soluções foram acetona/água 50/50% e acetona/solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) 50/50% v/v. A acetona foi utilizada para garantir a solubilização completa da enrofloxacin²². O efeito da exposição da solução de trabalho à radiação UV foi também avaliado. Esse último estudo se mostrará importante mais a frente por causa da instabilidade do analito frente à radiação de excitação.

Em nenhuma das condições estudadas foi detectada fosforescência em substratos contendo AgNO₃. A enrofloxacin adicionada no substrato a partir da solução preparada em acetona/água apresentou pequeno sinal fosforescente na presença dos sais TlNO₃ e CdCl₂.H₂O. Um maior sinal foi observado com Pb(NO₃)₂ (Figura 41). Quando a enrofloxacin foi preparada em meio contendo NaOH, o sinal fosforescente do analito pode ser observado em substratos sem átomos pesados. As características desse sinal foram muito próximas ao do sinal encontrado na presença TlNO₃ (Figura 42). Este resultado mostrou que a enrofloxacin foi sensível à presença de NaOH na solução de origem. Na presença de CdCl₂.H₂O e Pb(NO₃)₂ não foi observado sinal fosforescente do analito nessa condição.

O estudo realizado com solução de enrofloxacin irradiada com UV (60 min de exposição) não indicou nenhum aumento significativo de sinal foi observado em relação aos valores já descritos para soluções preparadas em acetona/água (Figura 43). Para a solução de enrofloxacin preparada em acetona/solução NaOH 0,1 mol L⁻¹, a irradiação provocou um grande aumento de sinal na presença do sal TlNO₃, indicando que o processo de irradiação induziu a formação de um derivado cuja fosforescência é favorecida na presença de tálio(I) (Figura 44). A partir desses testes, o desenvolvimento do método seguiu com a otimização das condições experimentais que promoveram esse sinal fosforescente mais promissor para a enrofloxacin.

Na Tabela 15 encontram-se resumidamente os resultados obtidos nos estudos preliminares. Nela, os valores de comprimento de onda máximos de luminescência assim como as razões entre os sinais dos analitos em relação aos

respectivos brancos (I_A/I_B razão entre o sinal fosforescente de cada um dos analitos e o sinal medido do substrato) são indicados.

Importante ressaltar que os sinais fosforescentes obtidos das soluções de enrofloxacinã não irradiadas tiveram uma grande variaçãõ, o que indicou que esses sinais estavam variando em funçãõ do tempo de exposiçãõ à radiaçãõ de excitaçãõ durante o processo de mediçãõ fosforescente.

Tabela 15: Fosforescência da enrofloxacinã e de seus derivados na presençã de diferentes sais de átomos pesados.

	Acetona/Água		Acetona/Soluçãõ NaOH 0,1 mol L ⁻¹	
	Sem irradiar	Irrradiado (60 min)	Sem irradiar	Irrradiado (60 min)
Ausência de átomo pesado	-----	$I_A/I_B = 1,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 270/436$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/463$	$I_A/I_B = 4,2$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/432$
TiNO ₃	$I_A/I_B = 1,5$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 254/490$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/494$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/425$	$I_A/I_B = 13$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 274/463$
CdCl ₂ .H ₂ O	$I_A/I_B = 1,5$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 254/438$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/439$	-----	$I_A/I_B = 3,3$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 274/443$
Pb(NO ₃) ₂	$I_A/I_B = 4,3$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/470$	$I_A/I_B = 7,8$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 246/455$	-----	$I_A/I_B = 2,0$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/472$
AgNO ₃	-----	-----	-----	-----

--- ausência de sinal fosforescente

$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ – comprimento de onda de excitaçãõ \ comprimento de onda de emissãõ

I_A/I_B – razão entre a intensidade sinal fosforescente do analito e do branco

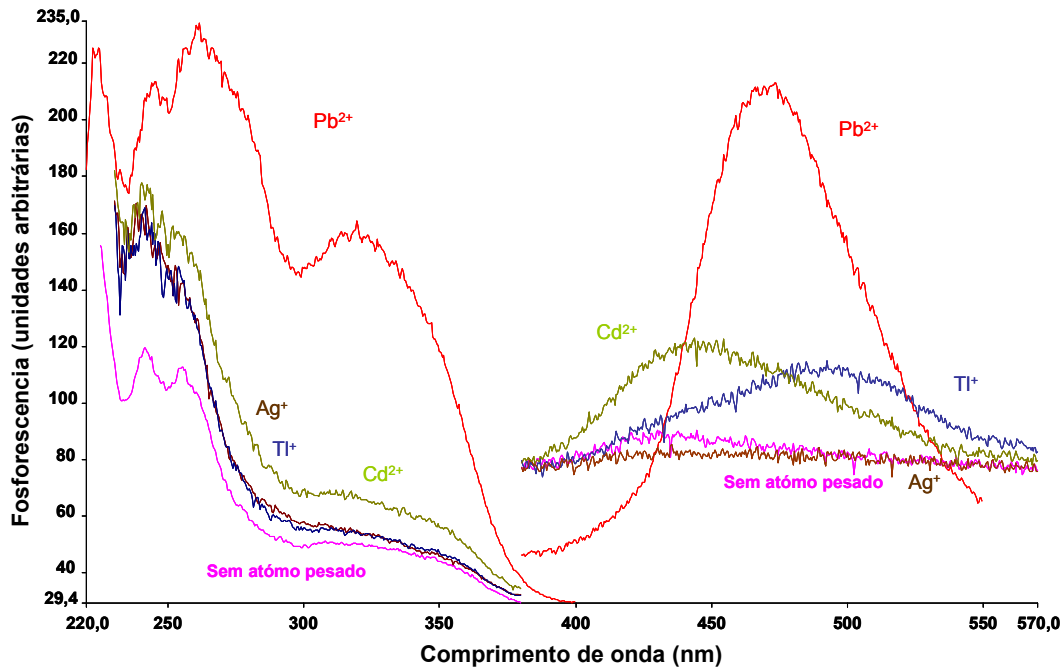


Figura 41: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com e sem a presença de sais de átomos pesados em acetona/água sem exposição ao UV.

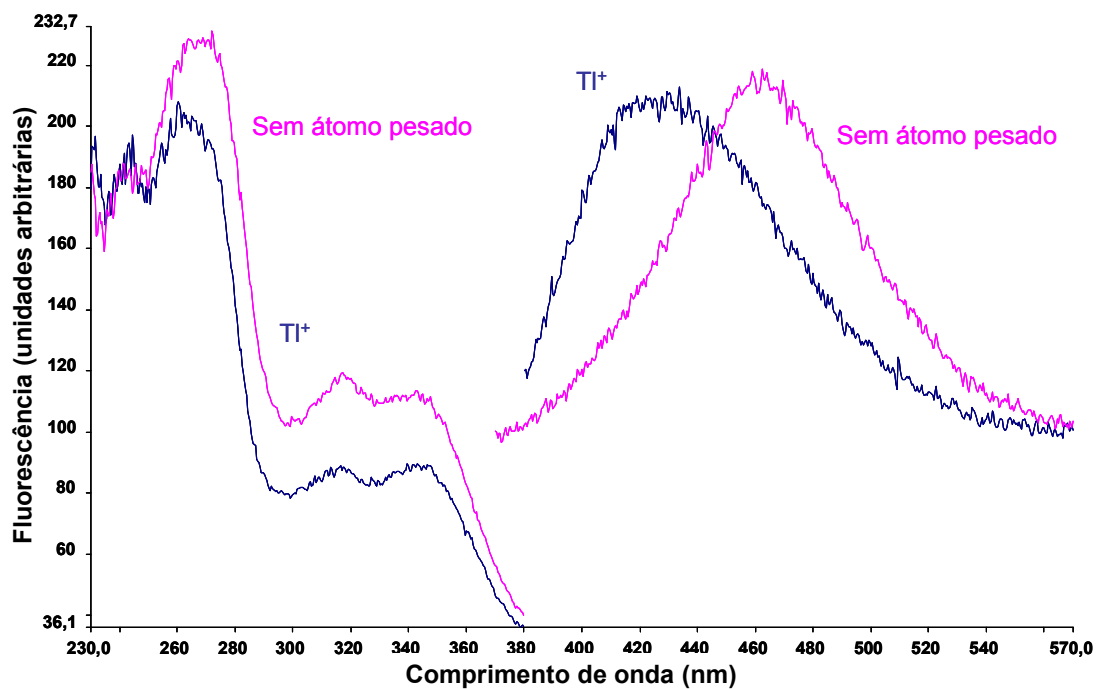


Figura 42: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em acetona/solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sem exposição ao UV.

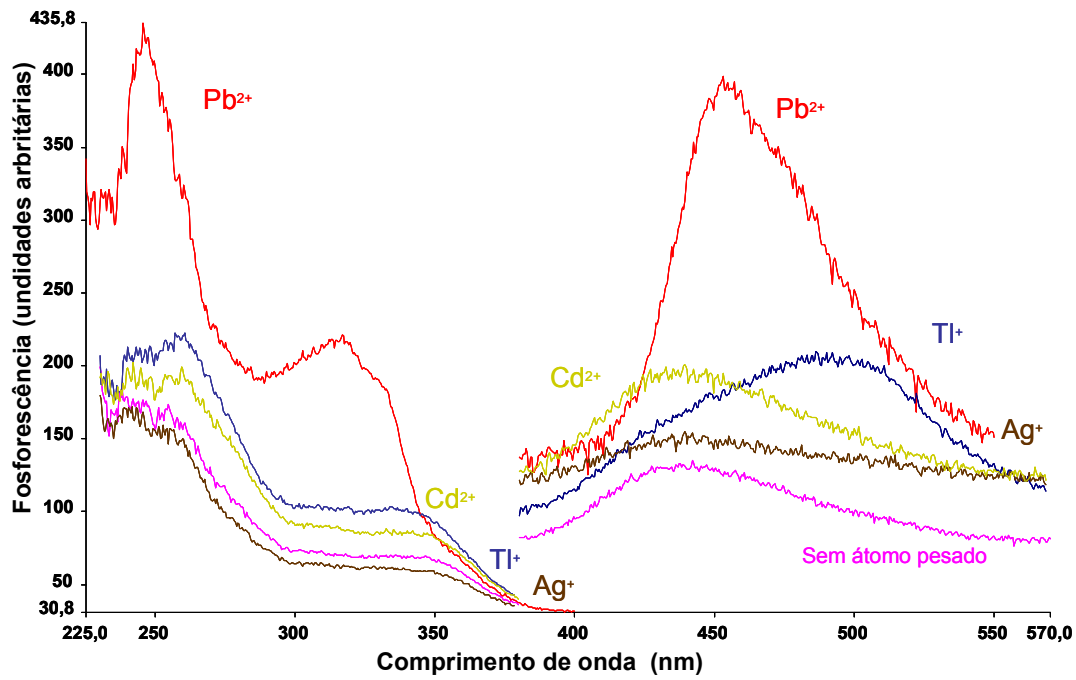


Figura 43: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em acetona/água após exposição ao UV.

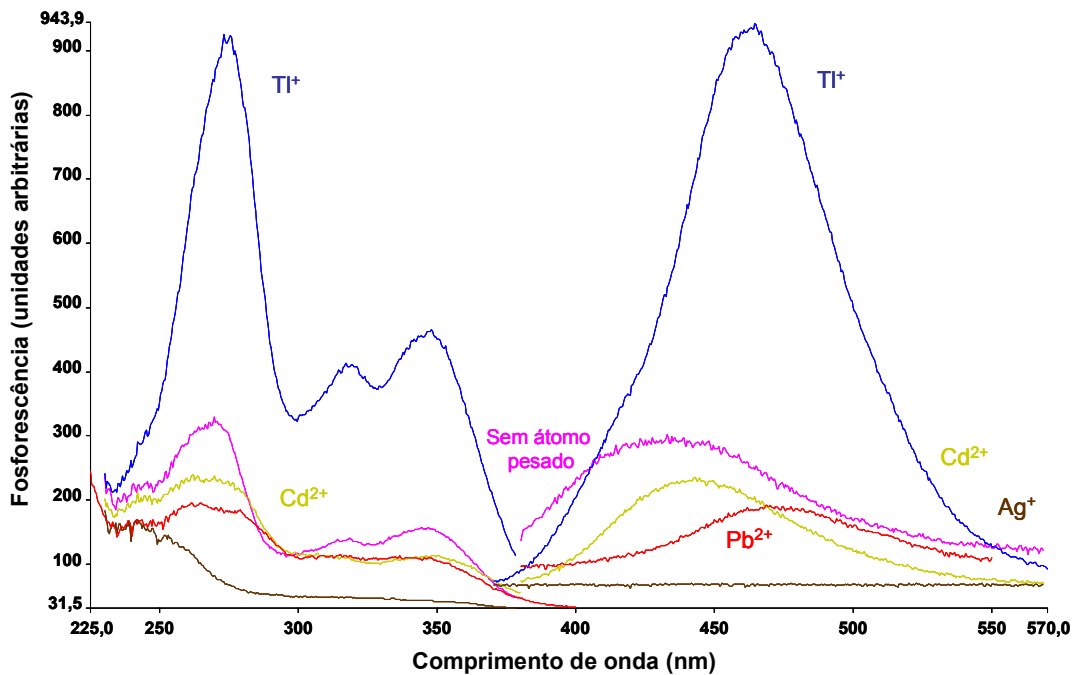


Figura 44: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em acetona/solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após exposição ao UV.

4.3.2. Otimização dos parâmetros experimentais

Com objetivo de maximizar o sinal fosforescente da enrofloxacin os parâmetros mais relevantes foram avaliados por estudo univariado. Os seguintes fatores foram estudados: (i) influência da quantidade do sal de átomo pesado no substrato sólido (ii); concentração de NaOH na solução de analito; (iii) influência da presença de surfactante (SDS) no substrato sólido e (iv) tempo de irradiação UV.

4.3.2.1. Influência da quantidade de sal de átomo

Conforme mencionado, o efeito externo do átomo pesado tem um papel muito importante na indução ou amplificação da fosforescência de substâncias orgânicas. O átomo pesado atua aumentando a velocidade do cruzamento entre os estados excitados singleto e tripleto, aumentando a intensidade fosforescente. Sabendo que a magnitude da amplificação de sinal fosforescente é dependente da quantidade depositada de sal de átomo pesado, foi realizada a otimização desse parâmetro experimental. Este estudo deve ser realizado de modo cuidadoso, pois se a quantidade do sal de átomo pesado estiver abaixo da quantidade ideal, poderá não haver observação de sinal fosforescente do analito de interesse ou a amplificação da fosforescência do mesmo poderá ser aquém do que potencialmente poderia ser obtido. Por outro lado, elevadas quantidades de sal podem acarretar em decréscimo do sinal fosforescente, provocado efeito pré-filtro que atenua a radiação do feixe de excitação incidente.

Para o teste, solução de enrofloxacin preparada em acetona/NaOH (0,1 mol L⁻¹) 50/50% v/v na concentração 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ foi utilizada após ser irradiada com UV durante 60 min, já que os testes preliminares mostraram aumento de sinal nessa condição. O estudo foi realizado com adição no substrato de volumes de 5 µl de soluções de TINO₃ em diversas concentrações (de 0,05 a 0,25 mol L⁻¹). Para estender a faixa estudada de quantidades de TINO₃ no substrato, adições sucessivas de 5 µl da solução 0,25 mol L⁻¹ de TINO₃ foram feitas no substrato. Assim, em termos de massa do sal, a faixa estudada foi entre 66,5 a 1332 µg. O resultado desse teste mostrou que uma faixa menor deveria ser analisada, pois o sinal fosforescente diminuiu com uma quantidade de TINO₃. Conseqüentemente, um novo estudo foi realizado com soluções de

TiNO₃ em uma faixa de concentração entre 0,01 a 0,20 mol L⁻¹ (de 13,3 a 266 µg). A concentração de sal que induziu melhor sinal para a enrofloxacinina foi 0,06 mol L⁻¹ (79,9 µg do sal), como mostra a Figura 45. Testes de robustez indicaram que uma variação de ± 0,01 mol L⁻¹ na concentração podem ocorrer sem alterar o sinal fosforescente da enrofloxacinina.

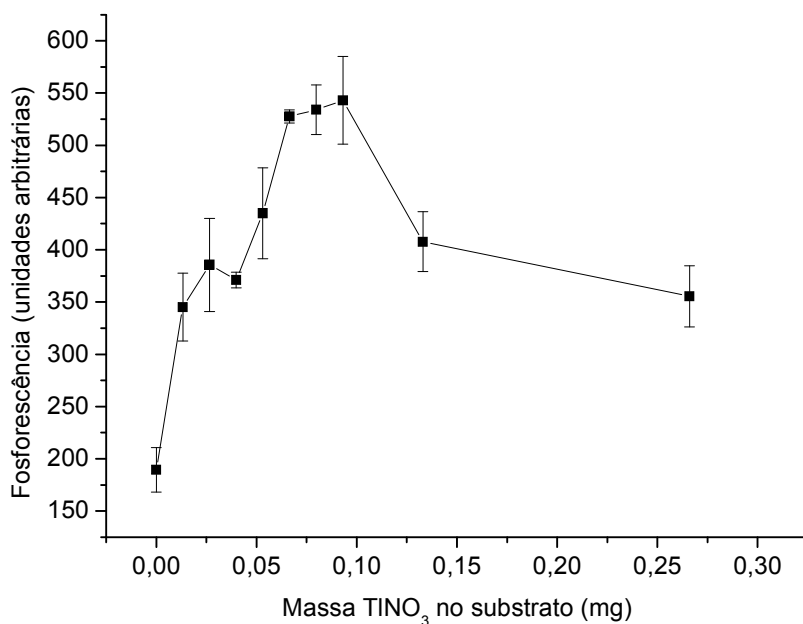


Figura 45: Influência da massa de TiNO₃ no sinal fosforescente da enrofloxacinina (89.8 ng).

4.3.2.2. Concentração de NaOH na solução de analito

O controle da concentração hidrogeniônica da solução do analito aplicada na matriz sólida é um fator que tem sido de grande importância na SS RTP. Normalmente, a intensidade do sinal é diminuída tanto em meios extremamente ácidos quanto em meios extremamente básicos.⁷⁹ Porém, isto não é uma regra e cada molécula pode ter um comportamento diferente em função da variação do pH. A protonação ou desprotonação de espécies químicas em solução pode também proporcionar criação de sítios com carga elétrica e uma melhor adsorção do analito quando depositado no substrato de celulose. Tal fato implica em maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel. No estudo realizado

por Nava²², o pH teve influência no sinal fosforescente das fluorquinolonas analisadas (levofloxacin, norfloxacin e ciprofloxacina).

Para os testes a solução de enrofloxacin $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em meio básico (acetona: solução de NaOH 50/50% v/v) sendo que a concentração final de NaOH foi variada entre 0,01 a 0,5 mol L^{-1} . Essas soluções foram irradiadas com UV por 60 min e em seguida depositadas nos substratos sólidos contendo 79,9 μg de TlNO_3 . O resultado obtido, Figura 46, mostrou que a intensidade do sinal fosforescente passa por um máximo em concentração final de NaOH igual a 0,05 mol L^{-1} , sendo que esse foi o valor ótimo escolhido para os demais estudos.

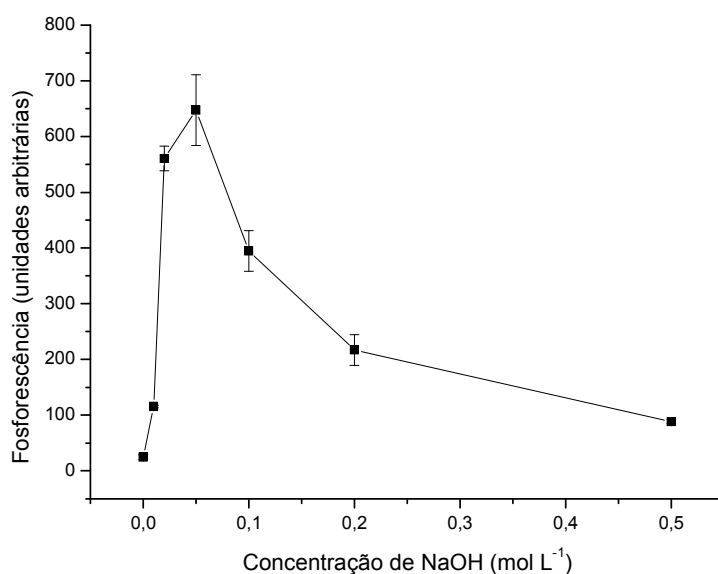


Figura 46: Influência da basicidade da solução do analito no sinal fosforescente da enrofloxacin (89.8 ng).

4.3.2.3.

Influência da concentração de SDS no substrato sólido

Modificadores de superfície, principalmente surfactantes, têm sido utilizados para melhorar as interações entre o analito, o íon de átomo pesado e o substrato de celulose. O efeito causado pelo surfactante tem se mostrado bastante dependente de sua quantidade no local onde o analito é aplicado, visto que usando uma grande quantidade do mesmo, pode haver um decréscimo de sinal fosforescente por causa da dificuldade de interação entre o átomo pesado e o analito.

O efeito do SDS depositado no substrato sólido foi estudado na faixa de concentração entre 0,01 a 0,25 mol L⁻¹ (13,3 a 333 µg). As condições experimentais otimizadas para concentração de NaOH e de massa de TINO₃ foram usadas. A solução de enrofloxacin foi irradiada por 60 min. O resultado, Figura 47, indicou que a presença de SDS não causou alteração significativa no sinal fosforescente da enrofloxacin.

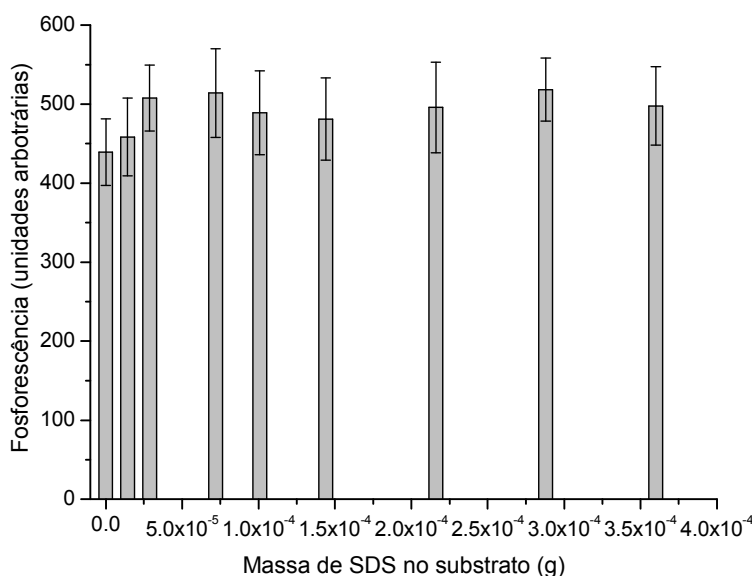


Figura 47: Estudo do sinal fosforescente da enrofloxacin em função da variação da massa de SDS depositado no substrato de papel na presença de 79,9 µg de TINO₃.

4.3.2.4.

Influência do tempo de exposição da enrofloxacin ao UV

O tratamento da solução de analito com UV pode gerar derivados fotoquímicos com características fosforescentes distintas dos compostos originais. Tal tratamento pode ser vantajoso por gerar fotoproduto com maior intensidade de sinal e/ou com modificações nas bandas espectrais.

Nos estudos preliminares, um maior sinal fosforescente foi observado quando a solução de enrofloxacin em meio básico foi irradiada com UV por 60 min. Adicionalmente, a exposição ao UV se mostrou necessária por causa da instabilidade do sinal do analito original durante o processo de medição de sinal luminescente. Nesse caso, ficou evidente que o sinal da enrofloxacin se modificava na medida em que a radiação de excitação incidia no substrato. Como o substrato deve ficar pelo menos 2 min no compartimento de amostra

antes da medição, esse tipo de degradação sem controle é um problema para o bom desempenho de um método analítico. Assim, o tratamento fotoquímico foi realizado também com o intuito de gerar um fotoproduto mais estável frente à radiação de excitação.

O estudo foi realizado com soluções de enrofloxacina (5×10^{-5} mol L⁻¹) preparadas nas condições otimizadas em meio básico e levadas ao reator fotoquímico onde foram expostas ao UV por diferentes tempos. As soluções irradiadas foram então adicionadas em substratos sólido contendo TINO₃.

Para cada caso (soluções irradiadas por tempos específicos) foram realizadas medições após diferentes intervalos de tempo de exposição do substrato à radiação de excitação no compartimento de amostra. Em outras palavras, as medições foram feitas em substratos (triplicata) após 2, 4 e 6 min de permanência no compartimento de amostra. A Figura 48 mostra a variação do sinal fosforescente em função do tempo em que a solução de analito ficou exposta à radiação UV no reator. Cada barra do gráfico representa a média dos sinais obtidos (levando em consideração todos os tempos de permanência no compartimento de amostra) e seu respectivo desvio padrão.

O gráfico (Figura 48) mostrou que com o tempo de radiação da solução de analito por 30 min, o sinal fosforescente foi maior em aproximadamente 2,5 vezes o sinal da solução não-irradiada. Nessa situação, foi também verificada uma pequena variação de sinal fosforescente (em torno de 4,8%). Esse resultado indicou estabilidade do analito frente à radiação de excitação no compartimento de amostra, ao contrario do resultado obtido com a solução não irradiada, cuja variação ficou em torno de 20%. O tempo de 30 min foi escolhido para irradiação da solução de enrofloxacina em meio básico.

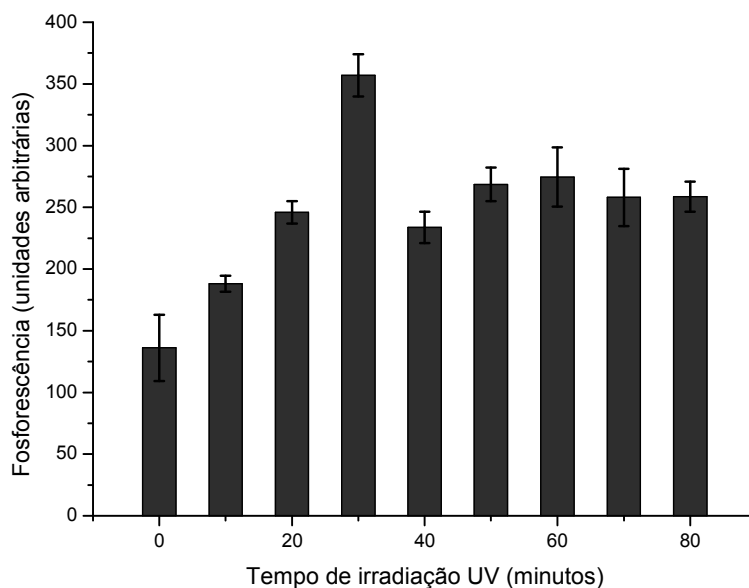


Figura 48: Estudo do tempo de irradiação UV no sinal fosforescente da solução da enrofloxacina em meio básico.

Estudos adicionais foram realizados visando compreender o processo de derivação fotoquímica da enrofloxacina. Para tal, soluções de enrofloxacina preparadas em meio básico foram analisadas por HPLC com detecção por fluorescência antes e após irradiação com UV. O método para as análises no HPLC foi adaptado do trabalho de Marazuela e Moreno-Bondi³⁴ como descrito no Capítulo 2.

Testes preliminares foram realizados para ajuste do método, como, a verificação da aplicação do método em amostra de enrofloxacina em meio básico, já que no método de referência a enrofloxacina é preparada em metanol. Como o interesse é apenas a verificação de possível sinal de um ou mais fotoproduto um teste foi feito para simplificar o método usando o modo isocrático com fase móvel acetonitrila: tampão fosfato (25 mmol L⁻¹ em pH = 3,0) 18:82% v/v. O resultado da Figura 49 mostrou que a adaptação do método para eluição isocrática foi viável, assim os estudos foram realizados nessa condição.

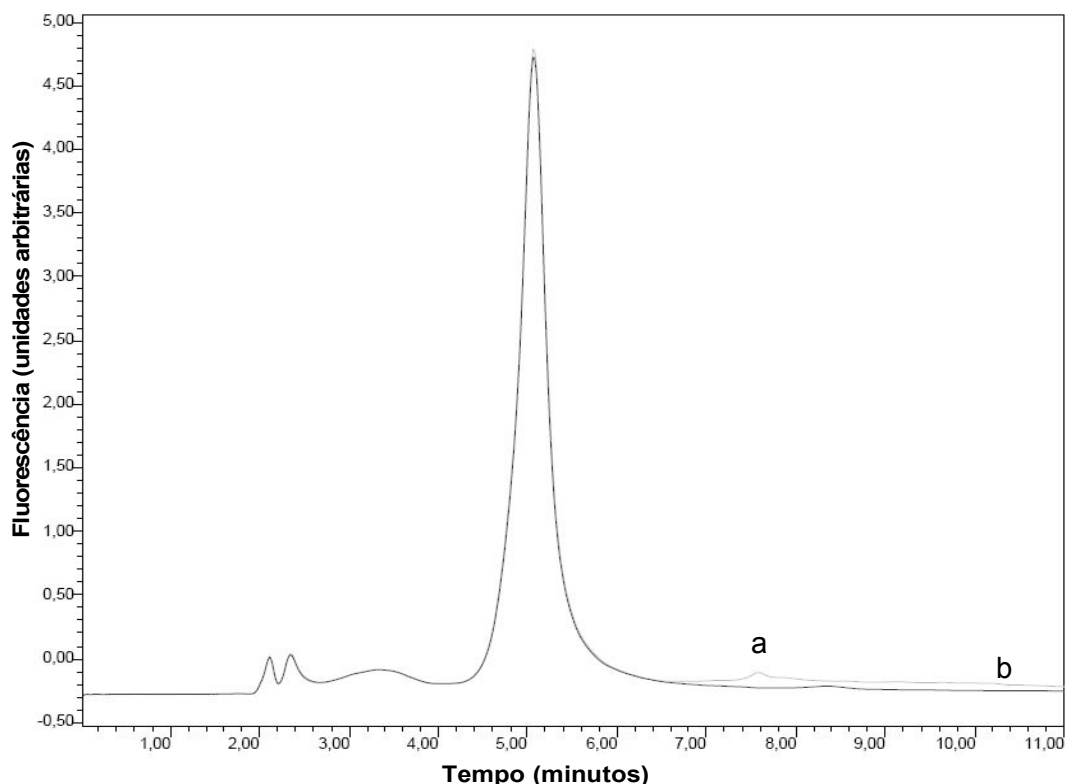


Figura 49: Cromatograma obtidos para solução de enrofloxacina com eluição isocrática (a) e com eluição com gradiente (b) de fase móvel.

Depois do ajuste de método, os testes foram realizados com soluções de enrofloxacina preparadas em meio básico e irradiadas com UV durante uma faixa de tempo entre 0 a 180 min com intervalos de 30 min. Pelo cromatograma (Figura 50) pode-se perceber que o sinal fluorescente original da enrofloxacina (tempo de retenção em 5,5 min) diminui bastante com os primeiros 30 minutos de irradiação UV, mas seu sinal ainda é intenso quando comparado aos pequenos picos que parecem no cromatograma com tempos de eluição de aproximadamente 3,5 e 4,5 min. Um outro pico pode ser percebido nesse cromatograma, mas com baixa intensidade, junto ao pico da enrofloxacina com eluição em aproximadamente 6 min.

Esses cromatogramas provavelmente não apontam o derivado fosforescente da enrofloxacina, pois a fosforescência não poderia ser medida no meio em questão e sem a presença do átomo pesado. No entanto, os resultados apontam a clara modificação na estrutura da enrofloxacina após tratamento com UV. Estudos adicionais devem ser feitos para se tentar identificar a estrutura do fotoproduto em questão.

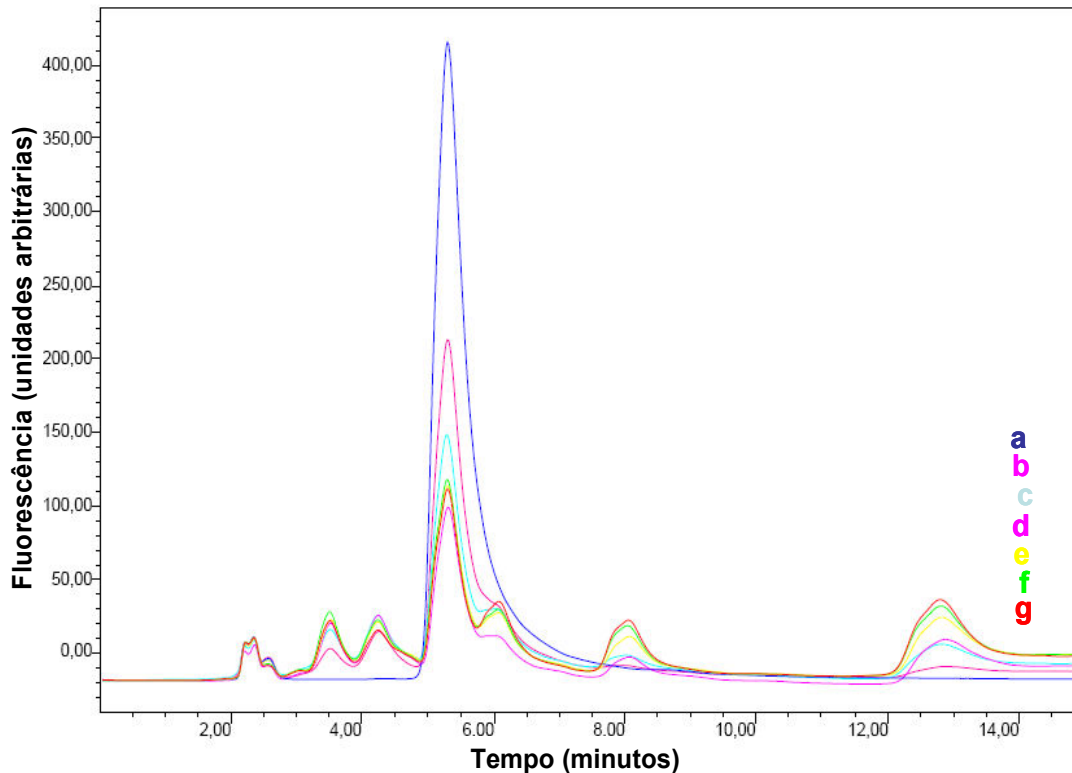


Figura 50: Análise das soluções de enrofloxacina irradiada com UV em diferentes tempos. Cromatogramas: (a) 0, (b) 30, (c) 60, (d) 90, (e) 120, (f) 150 e (g) 180 minutos.

As condições experimentais escolhidas para o método fosforescente são resumidas na Tabela 16.

Tabela 16: Condições experimentais para o método.

Parâmetros	Condições experimentais
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	274/463 nm
Preparo da solução do analito	Acetona:solução de NaOH (0,05 mol L ⁻¹) 50:50% v/v
Tempo de irradiação UV	30 minutos
Sal de átomo pesado	80 µg de TINO ₃

4.3.3. Validação do método

Seguindo os mesmos conceitos teóricos apresentados no Capítulo 3, o método fosforimétrico foi validado. As características de desempenho analisada para este método foram: linearidade, detectabilidade, exatidão, precisão e

incerteza de medição de fosforescência. Os conceitos teóricos para o cálculo das incertezas serão discutidos assim como os resultados encontrados.

4.3.3.1. Linearidade

Para estudo da linearidade da enrofloxacinina uma curva analítica foi feita utilizando a relação entre a massa de analito depositado no substrato e sinal fosforescente medido na condição ótima. Os parâmetros da curva foram determinados pela regressão linear simples obtida pelo método dos mínimos quadrados (sabendo que sua aplicação deve ser realizada em caso de homoscedasticidade nos pontos amostrados). A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2), para avaliar homogeneidade das variáveis foram realizados os testes t de Student, a prova F de Fischer, o intervalo de confiança do coeficiente angular e também pelo gráfico de resíduos⁹⁰.

A faixa linear para a determinação da enrofloxacinina ficou no intervalo entre 8,99 ng (5 μ L da solução 5×10^{-6} mol L^{-1}) a 180 ng (5 μ L da solução 1×10^{-4} mol L^{-1}) de massa do analito. A Figura 51 apresenta duas curvas analíticas para a enrofloxacinina obtidas em dias diferentes. Cada ponto da curva representa a média de três medições do sinal fosforescente.

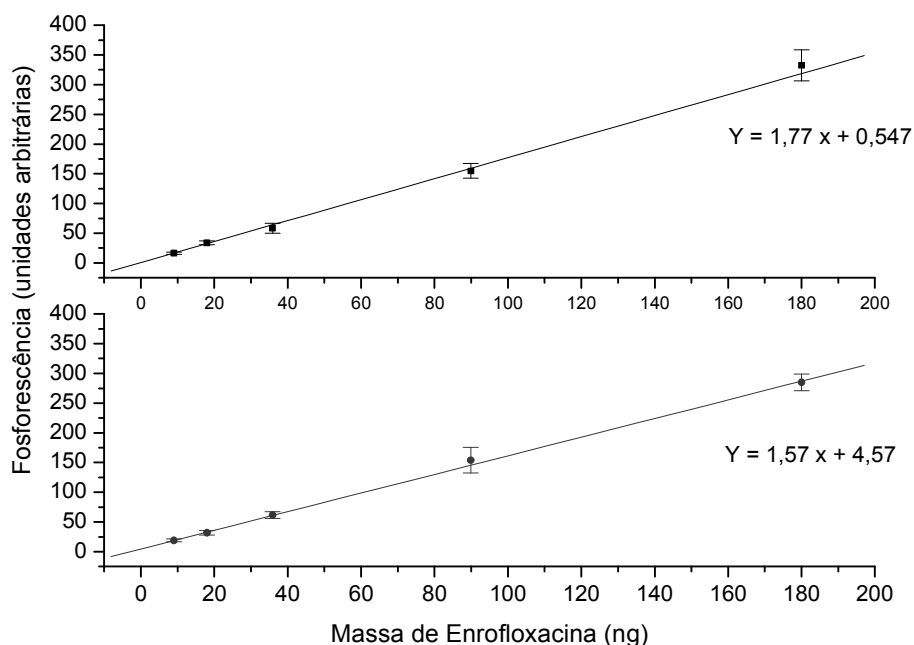


Figura 51: Curva analítica para enrofloxacinina.

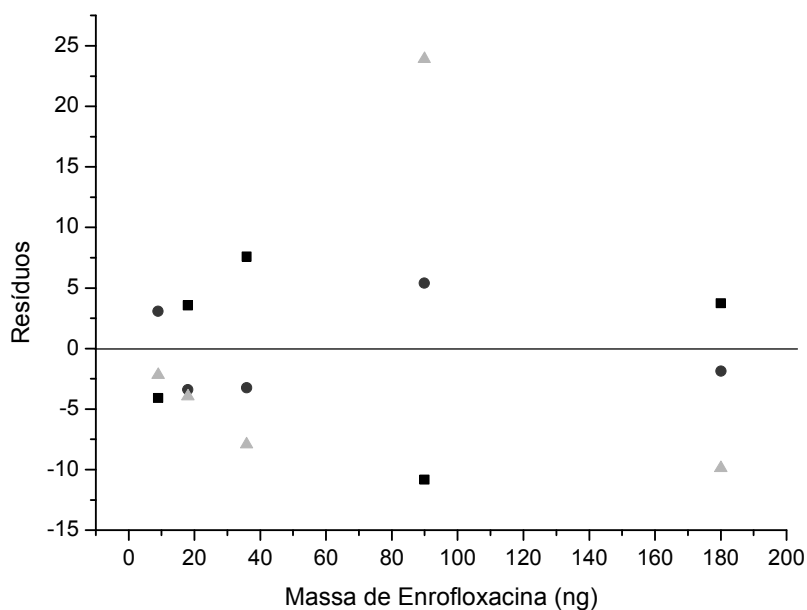


Figura 52: Gráfico de resíduos da curva analítica para enrofloxacina.

Tabela 17: Parâmetros da curva analítica da enrofloxacina

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	1,77 ± 0,06	1,57 ± 0,04
Coefficiente linear	0,547 ± 0,131	4,57 ± 0,73
R ²	0,998	0,999
R ² _{adj}	0,998	0,998

O comportamento linear foi indicado pelos valores dos coeficientes de determinação (R^2) e pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), superiores a 99% (Tabela 17). Os desvios padrões dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenada está muito próxima do valor zero, indicando ausência de erro sistemático. Já os desvios padrões dos coeficientes angulares representam à boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições.

O gráfico de resíduos aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando o comportamento linear da curva analítica (Figura 52).

A adequação do modelo linear pode ser avaliada através dos testes F e t de Student e pelos valores de p. Pelo teste F realizado pelo princípio da ANOVA ($F_{cal} = MQ_{reg}/MQ_{res}$) a adequação do modelo pode ser confirmada. Os valores de F apresentados na Tabela 18 indicam a não existência de relação linear ($F_{calc} >$

$F_{\text{crítico}}$), ou seja, se aceita a equação da regressão linear ($\alpha = 0,05$ e $F_{\text{crítico}} = 10,3$). Os valores de t calculados (41,5 e 54,7) mostram que a hipótese nula (suposição de que a área do pico e a concentração de analito não se relacionam linearmente) pode ser rejeitada, pois esses valores são superiores ao valor de t crítico ($t_{0,05,4} = 2,776$). Os valores de p são menores do valor de α (significância) para o qual rejeitamos a hipótese nula para esta curva analítica. Se $\alpha=0,05$, então, para um valor $p \geq 0,05$ não se rejeita H_0 , caso contrário, rejeita-se H_0 . No caso deste estudo, $p < 0,05$. Assim, temos que, no nível de 5% de significância, rejeita-se H_0 , resultando em um modelo que relaciona linearmente a área do pico com a concentração do analito. A partir dos diversos testes estatísticos, pôde-se concluir que o método apresenta resposta linear para a enrofloxacin.

Tabela 18: Valores da análise da variância (ANOVA) para enrofloxacin.

Padronização interna	Curva 1	Curva 2
F_{cal}	1719	2997
t_{cal}	41,5	54,7
P_{cal}	$3,09 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-5}$

4.3.3.2. Detectabilidade

Os limites de detecção do método foram calculados por dois critérios já apresentados: $LD = x_b + 3s_b$ e $LD = 3s_b / a$. No caso da SSRTP, onde o sinal do branco pode ser relevante, o primeiro critério parece ser o mais adequado pois leva em consideração o sinal do branco (x_b). No caso da técnica SSRTP, o limite de detecção também pode ser expresso em termos de massa efetiva de analito depositado no substrato (limites de detecção absoluto, LDA) considerando 5 μL de amostra, o que permite avaliar a capacidade de detecção em termos de massa. O LDA pode ser expresso como indicado na Equação 29:

$$LDA = (LD) \cdot V \cdot MM \quad (29)$$

onde “ V ” é o volume depositado no substrato (5 μL) e “ MM ” é a massa molar do analito em g mol^{-1} .

O procedimento de avaliação do LQ foi semelhante à do LD, foi estimado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 10 vezes o desvio padrão do branco ($LQ = x_b + 10s_b$) e por meio de

parâmetros da curva analítica ($LQ = 10s_b/a$). No caso da massa efetiva de analito (limite de quantificação absoluto, LQA) a equação similar à usada no cálculo do LDA foi aplicada.

A determinação dos LD e dos LQ foi feita considerando a análise de 10 amostras em branco e os resultados são apresentados na Tabela 19.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação pelos dois critérios utilizados foram próximos, sendo o parâmetro mais realista para detectabilidade em SS RTP aquele que leva em consideração a magnitude do sinal do branco.

Tabela 19: Parâmetros da sensibilidade da enrofloxacin.

Parâmetros	$3s_b/a$		$x_b + 3s_b$		$10s_b/a$		$x_b + 10s_b$	
	LD (mol L ⁻¹)	LDA (ng)	LD (mol L ⁻¹)	LDA (ng)	LQ (mol L ⁻¹)	LQA (ng)	LQ (mol L ⁻¹)	LQA (ng)
Enrofloxacin	$6,24 \times 10^{-7}$	1,12	$1,18 \times 10^{-6}$	2,12	$2,08 \times 10^{-6}$	3,74	$2,64 \times 10^{-6}$	4,74

4.3.3.3. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação nos medicamentos Flotril e Baytril contendo enrofloxacin (formulações farmacêuticas contendo enrofloxacin e que são utilizadas na medicina veterinária). Nesse caso, foi realizada a comparação de resultados do SS RTP com o de um método de referência (HPLC-fluorescência).

O procedimento de preparação das amostras comerciais foi ajustado para que a concentração esperada de enrofloxacin nas soluções estoque dos medicamentos fossem $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Alíquotas de 200 µL dessas soluções foram coletadas para balões volumétricos de 5 mL e diluída com acetona/NaOH (0,05 mol L⁻¹) 50/50 % v/v para se obter soluções de trabalho de $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As soluções foram irradiadas com UV (30 min), sendo em seguida adicionadas no substrato de celulose para determinação fosforimétrica. Para a análise por HPLC, as alíquotas de 200 µL retiradas foram diluídas em metanol.

Os resultados encontrados pela análise das amostras dos medicamentos pelo método fosforimétrico e por HPLC foram comparados com as concentrações de enrofloxacin descrita em suas respectivas bulas.

Tabela 20: Valores das recuperações encontradas na análise dos medicamentos por SS RTP e HPLC.

Amostras	SS RTP (%)	HPLC (%)
Comprimido	108 ± 8	91,6 ± 4,7
Injetável	107 ± 7	96,6 ± 6,7

Valor esperado nas soluções: Comprimido = $1,03 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; Injetável = $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A comparação de resultados obtidos empregando-se o método SS RTP e o método de referência (HPLC) foi feito de modo a avaliar o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. As análises foram efetuadas em replicatas autênticas (com seis soluções independentes de amostra), utilizando o método em desenvolvimento e o método de referência³⁴, nas mesmas amostras de medicamentos em concentrações iguais.

A comparação entre os métodos SS RTP e HPLC foi feita aplicando-se o teste de hipótese, com comparação de médias. Curvas analíticas foram realizadas em ambos os métodos. Os resultados obtidos mostraram que não existe diferença significativa para o nível de 95% de confiança ($t_{\text{cal}} = 0,975$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,228$) para as amostras analisadas. A Tabela 21 mostra os valores dos parâmetros calculados para o teste estatístico realizado nas amostras.

Tabela 21: Resultado do teste de comparação entre SS RTP e HPLC para enrofloxacina.

Parâmetros	Amostra injetável	Amostra comprimido
Sp	$9,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-6}$
t_{cal}	0,480	1,04
gl	10	10

S_p = desvio padrão agrupado.

4.3.3.4. Precisão

Para o estudo de repetitividade da enrofloxacin, o cálculo foi feito a partir do desvio padrão relativo (%RSD), realizando dez medições de uma mesma amostra sob as mesmas condições. A repetitividade foi avaliada em três diferentes níveis de concentração.

Para medições sucessivas no mesmo substrato, a repetitividade da enrofloxacin apresentou variações de 0,69 a 3,49%, sendo consideradas excelentes para esta técnica. Esse resultado também indicou a estabilidade do sinal do analito após o procedimento de fotoderivação. No entanto, no caso da SS RTP, as replicatas são realizadas utilizando substratos de papel distintos, ou seja, cada replicata é adicionada em um substrato de papel. Sendo assim, entende-se que para técnicas com esse tipo de característica, o estudo de repetitividade deve também ser realizado usando diferentes substratos. Neste caso, as repetitividades da enrofloxacin apresentaram um aumento significativo, quando comparado com os resultados anteriores medidos em seqüência no mesmo substrato. Os valores variaram entre 12,9 a 18,5%, indicando problemas de homogeneidade dos substratos (variação de sinal de fundo) e as pequenas diferenças na posição de aplicação das soluções no substrato (variação na posição de depósito da solução de analito e coadjuvante). A menor variação foi para o nível médio, que representa o meio da curva analítica onde a incerteza na medição é menor, para esse nível considerando as limitações o resultado obtido foi satisfatório (12,9%).

A reprodutibilidade interna foi calculada neste trabalho, sendo o analista a fonte de variação de medição. As estimativas das variâncias (dentro e entre os grupos) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), no programa Excel (Microsoft Office). A reprodutibilidade é calculada pelo desvio padrão relativo (%RSD) com os valores de MQ_{entre} que é a soma das médias quadráticas entre dias e MQ_{dentro} que é a soma dos médias quadráticas de cada dia (Equações 24 e 25).

Os resultados obtidos para a reprodutibilidade interna variaram entre 1,88 a 4,18%. Para todos os níveis estudados, a reprodutibilidade interna apresentou menor variação quando comparada com os valores de repetitividade com troca de substrato. Este fato indica que, o substrato é o fator mais relevante na degradação da precisão, não importante a troca de analista.

O teste F baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática dos valores obtidos entre analista (MQ_{entre}) é dividida pela média quadrática dos valores obtidos por um mesmo analista (MQ_{dentro}), foi utilizado para dizer se existe diferença significativa entre as médias obtidas. Pelos valores de F encontrados (Tabela 22) podemos dizer, com um nível de confiança de 95%, que não existe diferença significativa entre as médias obtidas pelos analistas, pois $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$ para todos os níveis ($F_{\text{crítico}} = 4,41$). Todos os dados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Precisão da enrofloxacina.

Nível	Repetitividade (%)		Reprodutibilidade interna (%) (troca de analista)	F_{cal}
	(mesmo substrato)	(troca de substrato)		
1	3,49	18,5	4,07	0,558
2	1,80	12,9	4,18	1,71
3	0,693	17,2	1,88	0,904

Níveis: 1 = $5,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 2 = $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 3 = $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3.5. Incertezas

Quando uma medição química é realizada, este resultado é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. A expressão completa de um resultado deve incluir a incerteza de medição. Segundo o guia EURACHEM/CITAC⁶³ a incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser obtidos em torno da média. Este parâmetro pode ser um desvio padrão ou a metade de um intervalo correspondente a um nível da confiança declarado. Para estabelecer a estimativa de incerteza de medição se faz necessário identificar as variáveis que contribuem para a incerteza, e quantificar seus valores. A incerteza de um resultado pode ser oriunda de diversas fontes, tais como: definição incompleta do mensurando, amostragem não representativa, homogeneidade da amostra, estabilidade da solução, pesagem, efeitos de matriz e interferências, equipamentos volumétricos, tendências pessoais na leitura de instrumentos analógicos, entre outras.

A implementação do ISO GUM (Guia para a expressão da incerteza de medição)⁹¹ parte da análise que o modelo matemático da medição (equação da medição propriamente dita) inclui todas as contribuições relevantes para o ensaio ou calibração. A incerteza global é então estimada pela lei da propagação da incerteza, seguindo a identificação e a quantificação da incerteza individual dos fatores de influência⁹². Previamente, para se calcular a estimativa da incerteza de medição alguns procedimentos precisam ser seguidos:

- (i) Especificar o mensurando, definindo claramente o que está sendo medido.
- (ii) Identificar fontes de incerteza, podendo utilizar o diagrama de causa e efeito para indicar as fontes relevantes de incerteza.
- (iii) Quantificar a dimensão do componente de incerteza associado a cada fonte potencial de incerteza identificada.
- (iv) Calcular a incerteza combinada.

Alguns componentes de incerteza podem ser avaliados experimentalmente a partir da dispersão de medições repetidas (uso da estatística freqüencista), conforme Equação 30.

$$u_{x_i} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (30)$$

onde “s” é desvio padrão calculado e “ \sqrt{n} ” é a raiz quadrada de n (número de replicatas)

Outros componentes da incerteza podem ser adquiridos a partir de informações existentes ou previamente obtidos, por exemplo, quando a estimativa de incerteza é originada de resultados e dados já existentes. Assumindo que cada grandeza de entrada (resultado) tem uma distribuição e um intervalo de confiança, a incerteza deve ser calculada com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular, triangular) correspondente a um nível de confiança declarado⁹³. A expressão que representa cada tipo de incerteza é apresentada na Equação 31.

$$u(x_i) = c \quad c = u_{\text{certificado}} = \frac{U_{(\text{declarada})}}{k} \quad (31)$$

onde “c” é a estimativa do resultado, “ $U_{declarada}$ ” é a incerteza expandida que deve ser extraída do certificado e “k” é o coeficiente de abrangência, normalmente para um nível de 95% de confiança.

Cada incerteza de entrada pode ser formada por uma ou várias contribuições, que também são combinadas para se ter o valor de cada incerteza de entrada. No processo de combinação das incertezas assume-se a independência entre essas fontes de modo a se usar a forma mais simples da lei da propagação da incerteza (soma quadrática das contribuições) como indicado na (Equação 32).

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (32)$$

onde: “ $u(y)$ ” é o resultado da combinação de incertezas; “ $\partial y / \partial x_i$ ” é o coeficiente de sensibilidade de cada fonte (coeficientes estes utilizados para transformar grandezas de entrada em incertezas, uniformizando as unidades das grandezas de entrada de modo a permitir que estas possam ser combinadas ao final do processo) e os valores “ $u^2(x_i)$ ” são as variâncias associadas a cada uma das fontes.

Outra consideração importante esta relacionada com o *Teorema Central do Limite* que mostra que uma distribuição estatística proveniente da combinação de outras distribuições não necessariamente normais resultará numa distribuição que tende a ser normal. Como as grandezas de entrada e obviamente as incertezas de saída são combinações de distribuições, essa situação parece ser razoável para o modelo estudado nesse trabalho.

Uma vez identificadas as fontes de incerteza de entrada e consideradas as suas contribuições, pode-se estimar a incerteza padrão combinada (u_c). A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada da soma quadrática das incertezas padrões relativas de todos os componentes que contribuem para a estimativa da incerteza de medição, Equação 33. Para se calcular as incertezas combinadas são necessárias os valores da incerteza padrão relativa de cada contribuição, que consiste na razão do valor obtido da incerteza padrão pelo valor variável.

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots} \quad (33)$$

onde $y(x_1, x_2, \dots)$ é uma função de vários parâmetros x_1, x_2, \dots

A incerteza expandida (U) é calculada a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada (u_c) pelo fator de abrangência k (graus de liberdade efetivos), como mostrado na Equação 34.

$$U = k_{v,p} u_c \quad (34)$$

A incerteza expandida corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95% (na verdade 95,45%) para um “ k ” calculado igual a 2, por se tratar de caráter amostral. O fator “ k ” está diretamente relacionado com o grau de probabilidade de acerto do cálculo da incerteza. O valor do fator de abrangência k deve levar em conta, além do nível de confiança desejado, o número de graus de liberdade efetivos associados ao caso para o intervalo $y-U$ a $y+U$. O valor de k geralmente está entre 2 e 3, mas pode assumir diversos outros valores. É comum calcular o número de graus de liberdade efetivos (v_{eff}) através da Equação 35, de Welch- Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (35)$$

onde “ u_c ” é a incerteza combinada, “ u_i ” é a incerteza padronizada associada à i -ésima fonte de incerteza, “ v_i ” é o n° de graus de liberdade associado à i -ésima fonte de incerteza, “ N ” é o n° total de fontes de incertezas analisadas.

Da aplicação da Equação 35, resulta o número de graus de liberdade efetivo. O valor “ k ” para o nível de confiança de 95% pode então ser obtido da tabela estatísticas.

O resultado da medição é, então, convenientemente expresso como:

$$Y = y \pm U \quad (36)$$

Este resultado significa que a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando Y é y , com $[y - U$ a $y + U]$ sendo o intervalo no qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a Y .

As incertezas para este trabalho foram calculadas com base no trabalho realizado por Cunha⁶⁵. Neste trabalho um diagrama de causa e efeito para a

medição de fosforescência por SS RTP, onde se encontra selecionados os componentes relevantes para os cálculos (Figura 53).

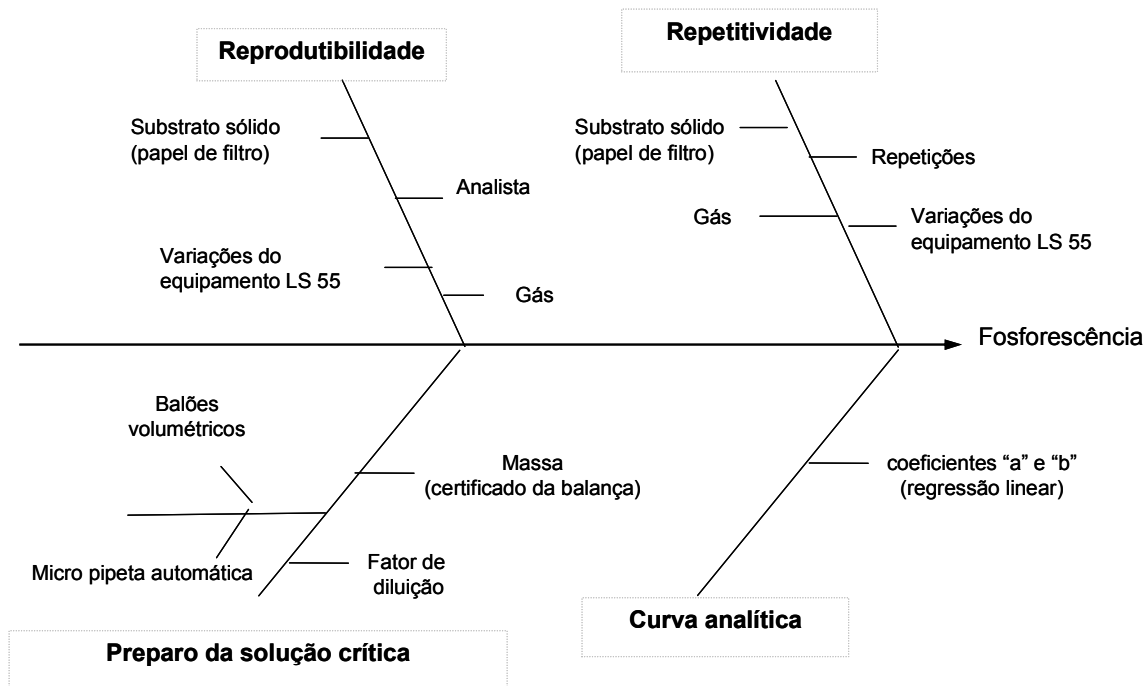


Figura 53: Diagrama de causa e efeito para a técnica SS RTP.

As incertezas de entrada são agrupadas em quatro grupos: principais e estimadas para cada componente relevante: (i) Preparo de Soluções Críticas, (ii) Repetitividade, (iii) Reprodutibilidade, (iv) Curva analítica. Uma vez estimada a incerteza de cada componente é possível calcular a incerteza combinada e expandida.

A incerteza associada à repetitividade da amostra (u_{repe}) foi calculada pela estimativa do desvio padrão " s_r ", com dez repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições. E a incerteza associada à reprodutibilidade da amostra foi calculada pela estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade " s_R ", através de 10 substratos distintos de uma mesma amostra para cada analista, sob as mesmas condições. A estimativa da incerteza da reprodutibilidade (u_{repro}) foi calculada pela soma dos quadrados dos desvios da repetitividade de cada analista " s_r " e entre os analistas " s_{entre} ", conforme Equação 37.

$$\mu_{Repro} = \sqrt{(s_r^2 + s_{entre}^2)} \quad (37)$$

A estimativa da incerteza do componente curva foi calculada com base nos coeficientes da curva analítica, Equação 38.

$$u_{curva} = \sqrt{\left[(c_{i_a}^2 \times s^2 a) + (c_{i_b}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{i_a} \times c_{i_b} \times u_a \times u_b \times r) \right]} \quad (38)$$

onde: c_{i_a} é o coeficiente de sensibilidade igual a $\frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2}$ (“b” interceptão da reta); c_{i_b} é o coeficiente de sensibilidade igual a $-1/a$ (“a” inclinação da reta); u_a é a incerteza de “a” e é igual a $\sqrt{s^2 a}$ (“ $s^2 a$ ” = $\frac{s^2 \times \sum C^2}{D}$); u_b é a incerteza de “b” e é igual a $\sqrt{s^2 b}$ (“ $s^2 b$ ” = $\frac{n \times s^2}{D}$); D é o desvio padrão igual a $(n \times \sum C^2) - (\sum C)^2$; “C” é a concentração em mol L⁻¹ e “r” é a razão entre “a, b” e é igual a $-\frac{\sum C}{\sqrt{(n \times \sum C^2)}}$.

Conforme descrito, os parâmetros massa, micropipeta e balão volumétrico contribuem na estimativa da incerteza associada ao preparo de soluções críticas. Sendo assim, a incerteza associada ao preparo de soluções críticas (u_s) foi calculada conforme a Equação 39.

$$u_s = \sqrt{\left[\left(\frac{u_{mp1}}{k} \right)^2 + \left(\frac{u_{mp2}}{k} \right)^2 + \left(\frac{u_{bv}}{k} \right)^2 \right] \times (u_{fd}) + \left(\frac{u_{bal}}{k} \right)^2} \quad (39)$$

onde: “ u_{mp1} ” é a incerteza da micropipeta de 20-200 μ L, “ u_{mp2} ” é a incerteza da micropipeta de 5 μ L, “ u_{bv} ” é a incerteza do balão volumétrico, “ u_{fd} ” é a incerteza do fator de diluição, “ u_{bal} ” é a incerteza da balança e, K é o fator de abrangência de cada componente. A razão entre o valor da incerteza expandida expressa no certificado “U” e o fator de abrangência “k” será a incerteza combinada (u_{comb}). Os certificados referentes às calibrações da balança, 2 micropipetas e balão volumétrico estão nos anexos I, II e III.

Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza foram calculadas a incerteza combinada e incerteza expandida, conforme cálculo apresentado nas Equações 40 e 41, respectivamente.

$$u_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_s^2 u_{curva}^2)} \quad (40)$$

$$U = u_c \times K \quad (41)$$

A Tabela 23 apresenta um resumo das incertezas calculadas para o nível de concentração de analito igual a $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 23: Valores das incertezas calculadas para os três níveis de concentração

Fontes de incertezas	Incertezas (mol L^{-1})
Preparo de soluções críticas	$9,14 \times 10^{-7}$
Repetitividade	$1,72 \times 10^{-5}$
Reprodutibilidade	$1,88 \times 10^{-6}$
Curva analítica	$4,76 \times 10^{-6}$
Incerteza combinada	$1,79 \times 10^{-5}$
Incerteza expandida	$3,59 \times 10^{-5}$

Uma vez identificada e calculada a incerteza de cada componente, é possível verificar quais destes componentes são mais relevantes para o processo. O gráfico de barra, Figura 54, apresenta a contribuição de cada componente de incerteza para o nível estudado. Considerando o valor de concentração pode - se confirmar que a maior contribuição de incerteza é a repetitividade.

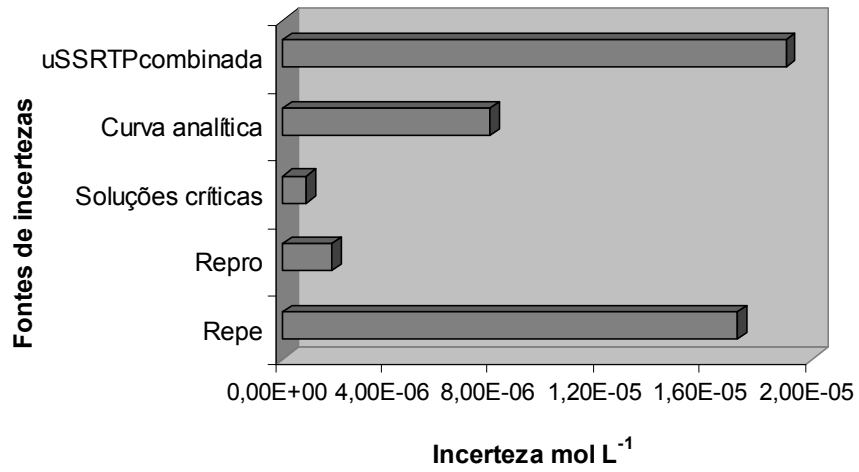


Figura 54: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente no nível estudado.