4 Camptotecina, irinotecana, topotecana – Desenvolvimento de métodos e resultados

4.1 Informações preliminares

Métodos analíticos para a camptotecina (CPT) e seus derivados, a irinotecana (CPT-11) e a topotecana (TPT), foram desenvolvidos. Estes alcaloides pertencem a um grupo de fármacos cuja importância na área médica recentemente demonstrada. Suas formulações farmacêuticas foi são relativamente novas no mercado e, por causa disso, poucos métodos analíticos são descritos na literatura para a determinação dessas substâncias. A grande parte dos métodos analíticos se restringe ao uso do HPLC. Sendo assim, dois métodos espectrofluorimétricos, um deles baseado na derivação fotoquímica com radiação UV, foram desenvolvidos para detectar e quantificar seletivamente CPT contendo CPT-11 TPT. Os em misturas ou métodos o espectrofluorimétricos propostos podem servir de alternativa aos métodos baseados em HPLC, permitindo uma detecção simples, rápida e barata de contaminações de CPT em formulações farmacêuticas cujo princípio ativo é a irinotecana ou a topotecana. Adicionalmente, foi desenvolvido um método baseado na cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), com detecção por fotometria de absorção, para a quantificação simultânea dos três alcaloides.

O detalhamento das pesquisas envolvendo o CPT e derivados é mostrado nas seções abaixo.

4.2 Método espectrofluorimétrico para determinação de CPT

4.2.1 Estudo das características fluorescentes do CPT e de seus derivados

A fluorescência do CPT e de seus derivados (CPT-11 e TPT) está associada à conjugação do anel quinolônico na estrutura dessas moléculas. Para o CPT, estudos realizados por *Posokhov et al*⁷⁶ mostraram que os comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) fluorescente do CPT não se deslocam em função da troca de solvente, independentemente da sua polaridade ou da capacidade de produzir ligações de hidrogênio. No entanto, maiores intensidades fluorescentes foram alcançadas em solventes mais polares (efeito hipercrômico). Partindo dessas informações e sabendo-se que o CPT é insolúvel em água, escolheu-se como solvente para medição de fluorescência, solução aquosa contendo 30% em volume, de metanol. Desta forma, foi garantida a total solubilização do CPT no sistema de solventes. A solubilidade do TPT e do CPT-11 nesse sistema de solventes não é problemática, pois estes se apresentam na forma de cloridratos solúveis em água, inclusive nas formulações farmacêuticas.

O CPT é um ácido fraco e seu anel lactônico pode ser facilmente aberto por hidrólise, promovendo a formação do grupo carboxilato. Apesar disto, a fluorescência do CPT é bastante intensa e constante ao longo de toda a faixa de valores de pH compreendidos entre 3 e 12 (ajustada através da utilização de tampão Britton-Robinson), como pode ser visto na Figura 19. O comportamento da fluorescência do CPT-11 em função do pH é similar ao do CPT, no entanto, a intensidade do CPT é cerca de duas a cinco vezes menor (dependendo do pH) do que a emitida pelo CPT-11 (Figura 19). Em contrapartida, a fluorescência do TPT é consideravelmente menos intensa e é muito dependente do valor pH da solução, tendo maiores valores no intervalo de pH entre 6 e 10 (detalhe na Figura 19). Em todos os casos, as bandas de fluorescência do CPT e de seus derivados têm o mesmo perfil, com λ_{exc} e λ_{em} respectivamente em 368 e 440 nm (Figura 20). Em tal situação, não se pode identificar uma condição seletiva para a determinação espectrofluorimétrica do CPT, sem a prévia separação deste do CPT-11 ou do TPT.



Figura 19: Influência do pH na intensidade fluorescente do CPT (1x 10^{-6} mol L⁻¹) e de seus derivados (1x 10^{-6} mol L⁻¹).



Figura 20: (a) Espectros de excitação e emissão fluorescente do CPT, CPT-11 e TPT, todos a 1×10^{-6} mol L⁻¹ e em pH original de suas soluções aquosas.

Uma vez que houve tendência decrescente para o sinal fluorescente do CPT-11 e do TPT em pH básico, foi realizado um estudo para avaliar a fluorescência do CPT e dos derivados em soluções fortemente alcalinas (soluções contendo diferentes concentrações de NaOH). Observou-se que na

medida em que a concentração de NaOH foi aumentada, ocorreram modificações CPT-11. acentuadas no perfil fluorescente do Mais especificamente, em soluções contendo concentrações de NaOH entre 1 e 2 mol L^{-1} houve deslocamentos no λ_{exc} de 368 nm para cerca de 410 nm (Figura 20a espectros 1 e 3) e no λ_{em} de 440 nm para cerca de 560 nm (Figura 20b espectros 1 e 3). Em contrapartida, nestas mesmas condições (em NaOH 1,0 mol L⁻¹), os comprimentos de onda máximos do CPT não foram alterados e, em termos da intensidade de sinal, quando comparada com a fluorescência obtida no pH original (pH 6) de suas soluções aquosas, uma diminuição da fluorescência desse composto foi observada no meio aquoso fortemente alcalino (Figura 20a e b – espectros 2 e 4). Apesar disso, a fluorescência do CPT ainda foi significativa para permitir quantificação sensível deste composto, como veremos nas seções seguintes. No caso do TPT, sua fluorescência continuou praticamente nula nas soluções fortemente alcalinas.



Figura 21: Influência do NaOH 1,0 mol L⁻¹ usado como solvente para CPT, CPT-11 e TPT (todos a 1 x 10^{-6} mol L⁻¹) no perfil dos espectros de (a) excitação e (b) emissão fluorescentes destes analitos.

Assim, os estudos em meio alcalino indicaram que um simples ajuste da concentração de NaOH das soluções de trabalho pode propiciar a eliminação de interferências espectrais do CPT-11 sobre a fluorescência do CPT, se as diferenças na posição das bandas espectrais do CPT em relação ao CPT-11 fossem adequadamente exploradas. No caso do TPT, a situação é aparentemente mais simples, pois o sinal dessa substância é totalmente eliminado no meio fortemente alcalino, permitindo apenas a observação do sinal do CPT. No entanto, uma vez que houve uma forte tendência decrescente no sinal do CPT conforme a concentração da solução de NaOH era aumentada, o sucesso do desenvolvimento de um método de análise dependeria da viabilidade de se encontrar um intervalo de concentração de NaOH no qual o sinal do CPT permanecesse constante, produzindo condições robustas para o ajuste desse parâmetro. Tal situação foi observada no intervalo de concentração de NaOH entre 0,95 e 1,05 mol L⁻¹, não indicando diferenças significativas na intensidade da fluorescência do CPT, como mostrado no gráfico da Figura 22 e nos espectros na Figura 23. Assim sendo, o estudo indicou que ao se ajustar a concentração de NaOH para 1,0 mol L⁻¹ e ao se usar as estratégias de varredura que tirem proveito dos valores diferentes para os máximos de emissão do CPT (440 nm) e do CPT-11 (560 nm), potencialmente se teria condições para determinação seletiva de CPT. No entanto, a viabilidade desse procedimento analítico ainda dependeria dos resultados dos testes de interferência, da avaliação dos parâmetros analíticos de mérito e da avaliação da incerteza associada à medição da fluorescência do CPT em tais condições. Tais avaliações são descritas a seguir.



Concentração da solução de NaOH (mol L⁻¹) Figura 22: Influência da concentração de NaOH na intensidade fluorescente do CPT.



Figura 23: Espectros de emissão e excitação fluorescentes do CPT em três diferentes concentrações de solução de NaOH.

4.2.1.1 Testes de interferência

Testes de interferência para avaliar a viabilidade da determinação seletiva do CPT foram realizados com misturas sintéticas (em solução aquosa de NaOH 1,0 mol L⁻¹) contendo diferentes razões molares de CPT/derivado. Para misturas CPT/TPT, varreduras sincronizadas com $\Delta\lambda$ = 82 nm (diferença entre os valores λ_{exc} (368 nm) e λ_{em} (450 nm) do CPT), foram utilizadas. Nas misturas CPT/CPT-11, foi usada a derivação de segunda ordem dos espectros de excitação, no qual um comprimento de onda isodiferencial (λ_{iso}), onde a contribuição do sinal do CPT-11 foi nula, foi encontrado em 267 nm, ajudando a minimizar os efeitos do sinal fluorescente do CPT-11 no CPT. A derivação dos espectros de emissão não indicou a presença de um λ_{iso} adequado, isso provavelmente foi causado pela longa cauda da banda de emissão do CPT-11 que se estendeu ao longo da região espectral da fluorescência do CPT. Na Tabela 4, as razões entre a fluorescência obtida de uma solução padrão de CPT ($2 \times 10^{-7} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) e a fluorescência de misturas contendo CPT ($2 \times 10^{-7} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) e quantidades crescentes de CPT-11 (I_{CPT}/I_{CPT-11}) ou TPT (I_{CPT}/I_{TPT}) são mostradas. Razões com valores de 0,95 a 1,08 indicaram que não há nenhuma interferência significativa do CPT-11 ou do TPT no sinal fluorescente medido para o CPT. Razões com valores significativamente mais baixos do que a unidade, implicaram em interferência espectral sobre o sinal do CPT.

Os resultados da Tabela 4 mostraram que não foram encontradas interferências na fluorescência do CPT em misturas contendo até 50 vezes mais TPT (CPT:TPT, 1:50). Nesse caso, a medição de sinal do espectro de varredura sincronizada foi feita em 368 nm (Figura 24). Interferência espectral na mistura (CPT:TPT, 1:100) é denunciada pelo valor I_{CPT}/I_{TPT} igual a 0,72. Já no caso das misturas que continham CPT-11, o sinal medido em 267 nm do espectro de excitação derivado em segunda ordem permitiu a contribuição nula do CPT-11 no sinal do CPT em misturas contendo concentrações com até dez vezes mais do interferente (CPT:CPT-11, 1:10). Esse fato pode ser visualizado nos espectros de fluorescência de segunda derivação do CPT e das misturas CPT:CPT-11 (Figura 25), demonstrando a viabilidade de utilizar estas condições para desenvolver o método analítico espectrofluorimétrico. Em misturas CPT:CPT-11, 1:50 a interferência espectral é grande e praticamente encobre a contribuição do sinal do CPT, como pôde ser constatado pelo valor I_{CPT}/I_{CPT-11} igual a 0,08.

Um resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação espectrofluorimétrica do CPT em misturas com CPT-11 ou com TPT é mostrado na Tabela 5.

CPT/CPT-11 (mol L ⁻¹)	Proporção	I _{CPT} /I _{CPT-11} ^a
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁷	1:1	1,08
2 x 10 ⁻⁷ /4 x 10 ⁻⁷	1:2	1,06
2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁶	1:5	0,95
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁶	1:10	1,05
2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁵	1:50	0,08
CPT/TPT (mol L ⁻¹)	Proporção	I _{CPT} /I _{TPT} ^b
2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁵	1:50	1,04
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁵	1:100	0,72

Tabela 4: Estudos de interferência na fluorescência do CPT

^a I_{CPT}/I_{CPT-11} – Razão entre a fluorescência medida em uma solução padrão de camptotecina e a fluorescência medida em uma mistura contendo camptotecina e irinotecana. Fluorescência medida em λ_{iso} = 267 nm

^b I_{CPT}/I_{TPT} - Razão entre a fluorescência medida em uma solução padrão de camptotecina e a fluorescência medida em uma mistura contendo camptotecina e topotecana. Fluorescência medida em 368 nm após varredura sincronizada (Δλ = 80 nm)



Figura 24: Espectro de varredura sincronizada ($\Delta\lambda$ = 82 nm) da fluorescência de (a) CPT 2 x 10⁻⁷ mol L⁻¹; (b) mistura de CPT:TPT 2 x 10⁻⁷: 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e (c) mistura de CPT:TPT 2 x 10⁻⁷: 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹



Figura 25: Espectro fluorescente de segunda ordem do CPT 1 x 10^{-6} mol L⁻¹ e da mistura CPT:CPT-11: a) branco; b) 1 x 10^{-6} : 0 mol L⁻¹; c) 1 x 10^{-6} : 2 x 10^{-6} mol L⁻¹; d) 1 x 10^{-6} : 5 x 10^{-6} mol L⁻¹; e) 1 x 10^{-6} : 0,1 x 10^{-6} mol L⁻¹; f) 1 x 10^{-6} : 0,5 x 10^{-6} mol L⁻¹.

Tabela 5: Resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação espectrofluorimétrica do CPT em misturas com CPT-11 ou com TPT.

Derivados	TPT	CPT-11
Proporção máxima CPT:derivado	1:50	1:10
Solvente	Solução aquosa de NaOH 1,0 mol L ⁻¹	Solução aquosa de NaOH 1,0 mol L ⁻¹
λ (nm)	368*	267 [*]
Tipo de varredura	sincronizada ($\Delta\lambda$ = 82 nm)	2ª derivação do espectro de excitação

 $^{*}\lambda_{iso}$

4.2.1.2 Parâmetros analíticos de mérito do método espectrofluorimétrico para o CPT

Parâmetros analíticos de mérito para o CPT foram obtidos nas duas condições estabelecidas para a sua determinação fluorimétrica na presença de CPT-11 ou na presença de TPT (indicados na Tabela 5).

Para a obtenção dos parâmetros relacionados com a resposta linear, três curvas analíticas foram construídas para cada uma das duas condições experimentais. Cada ponto das curvas foi o resultado médio de três medições de fluorescência. As curvas (Figura 26) foram construídas em função da concentração de solução de CPT e a melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada pelo método dos mínimos quadrados com a ajuda do programa Origin 6.0. O comportamento homoscedástico foi confirmado nas duas situações através dos gráficos de resíduos (Figura 27).

No caso do CPT nas condições otimizadas para a sua determinação na presença de CPT-11, verificou-se uma faixa linear ($r^2 = 0.9972$) que se estendeu até a concentração de 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (Figura 26a). Já nas condições otimizadas para a determinação de CPT na presença de TPT, observou-se uma faixa linear $(r^2 = 0.9991)$ que vai até a concentração de 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de CPT (Figura 26b).

A precisão das medições foi avaliada pelo ensaio de repetitilidade, que avalia o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas em uma mesma amostra sob as mesmas condições (mesmo instrumento, mesmo operador)^{80,81}. O valor de precisão foi expresso através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD), para o qual foram usadas soluções de CPT (em NaOH 1 mol L⁻¹) na concentração de 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, cujos valores de fluorescência foram lidos por 6 vezes consecutivas. Os resultados, que variaram entre 3,17% e 3,88%, são mostrados na Tabela 6.

A detectabilidade dos métodos desenvolvidos foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção (LD) e dos limites de quantificação (LQ). O LD foi determinado através de 10 leituras da solução de menor concentração de CPT na curva analítica (menor concentração que pode ser analisada), e o desvio padrão (s_b) destas 10 medições multiplicado por três. Para o LQ, este mesmo desvio padrão (s_b) das medições foi multiplicado por 10.

Conforme indicado na Tabela 6, os valores de LD e de LQ para o CPT nas duas condições experimentais foram bastante similares (na mesma ordem de grandeza).



Figura 26: Curvas analíticas para o CPT em NaOH 1,0 mol L⁻¹ obedecendo as condições para determinação seletiva: (a) Espectros de 2ª derivada (quando CPT-11 está presente); (b) Espectros de varredura sincronizada (quando TPT está presente).



Figura 27: Gráficos de resíduos para as determinações fluorimétricas de CPT em NaOH 1,0 mol L⁻¹ através da (a) 2^a derivação do espectro de excitação (CPT na presença de CPT-11) e da (b) varredura sincronizada (CPT na presença de TPT).

Condições da medição	Espectro de segunda derivada (quando CPT-11 está presente)	Espectro sincronizado (quando TPT está presente)
λ	267 nm ^a	368 nm⁵
Equação da curva	$y = 3,43 \times 10^7 X + 0,54$	$y = 4,20 \times 10^7 X + 5,84$
R ²	0,9972	0,9991
Precisão ^c	3,17%	3,88%
Limite de detecção ^d (3s _b)	2,9 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	2,3 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹
Limite de quantificação ^d (10s _b)	9,7 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	7,5 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹

Tabela 6: Parâmetros analíticos de mérito encontrados para o CPT em condições otimizadas para a sua determinação na presença de CPT-11 ou de TPT.

^a comprimento de onda isodiferencial (λ_{iso}).

^b Espectro sincronizado com $\Delta\lambda$ = 82 nm.

^c Precisão calculada pela repetitividade tendo o CPT na concentração de 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹

^d Limite de detecção e limite de quantificação baseados no desvio padrão (S_b) de 10 leituras da menor concentração de CPT que se consegue medir na curva analítica. Este S_b é multiplicado por 3 para o LD e por 10 para o LQ.

4.2.1.3 Cálculo da incerteza associada à medição da fluorescência da CPT

Fontes relevantes para a incerteza associada à medição de fluorescência do CPT sob as condições seletivas estabelecidas no presente trabalho foram divididas em quatro diferentes grupos principais: i) repetitividade (u_r), ii) reprodutibilidade (u_R), iii) curva analítica (u_{curva}), e iv) preparação de soluções (u_s). A definição detalhada de cada um desses grupos é discutida no Capítulo 6.

O valor de u_r foi avaliado pela variação estatística de medições sequenciais de fluorescência (n = 10) de uma solução padrão de CPT 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ para as duas condições estabelecidas (em λ = 368 nm, utilizando espectros sincronizados e em λ_{iso} = 267 nm, utilizando os espectros de segunda derivada). O valor de u_R foi obtido a partir da realização das medições feitas por dois analistas diferentes, onde cada um obteve um conjunto de 10 medições de soluções de CPT 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. A incerteza associada ao preparo de soluções (u_s), levou em consideração as etapas e as incertezas dos aparatos usados na preparação das soluções de CPT 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ por ajuste de massa. A fim de se obter a *u_{curva}*, a fluorescência de cada um dos padrões de CPT (de 2 x 10⁻⁷ a 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹) da curva analítica foi medida em triplicata. A incerteza combinada (*u_c*) foi obtida pela soma quadrática destas quatro contribuições:

 $u_c = (u_r^2 + u_R^2 + u_{curva}^2 + u_s^2)^{1/2}$. Finalmente, a incerteza expandida (*U*) foi dada pelo produto de u_c pelo fator de abrangência (k), que neste caso foi 2, a fim de expressar a incerteza a um intervalo de confiança com nível de probabilidade de 95,4%.

Os resultados para cada fonte de incerteza, assim como os valores das incertezas combinada e expandida são indicados na Tabela 7. A incerteza expandida (*U*) associada à medida de fluorescência de um padrão de CPT 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ foi de 6,94 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ (com λ_{iso} = 267 nm e espectro de segunda derivada) e igual a 1,23 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ (com λ = 368 nm, usando espectro de varredura sincronizada). Esses valores equivalem respectivamente a 25 e 14% da concentração nominal do CPT (5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹).

Tabela 7: Valores de incerteza calculados para o método fluorimétrico utilizado na determinação de CPT (5 x 10^{-7} mol L⁻¹).

	Espectro de segunda derivada (λ=267 nm)	Espectro sincronizado (λ=368 nm)
Fontes de incerteza	Valor de incerteza	Valor de incerteza
	(mol L ⁻¹)	(mol L⁻¹)
Repetitividade (u _r)	9,29 x 10 ⁻⁹	5,60 x 10 ⁻⁹
Reprodutibilidade (u _R)	9,31 x 10 ⁻⁹	7,93 x 10 ⁻⁹
Curva analítica (u _{curva})	1,44 x 10 ⁻⁸	5,37 x 10 ⁻⁸
Preparo da solução (u _s) ^a	2,87 x 10 ⁻⁸	2,87 x 10 ⁻⁸
Incerteza combinada (u _c)	3,47 x 10 ⁻⁸	6,17 x 10 ⁻⁸
Incerteza expandida* (U)	6,94 x 10 ⁻⁸	1,23 x 10 ⁻⁷

^a preparados por massa de amostras, padrões e solventes

4.2.1.4

Testes de recuperação em formulações farmacêuticas e comparação com método analítico de referência

A viabilidade da aplicação dos métodos foi testada através de testes de recuperação em formulações farmacêuticas de CPT-11 e de TPT fortificados com CPT para simular contaminação das formulações. Um método analítico, baseado no uso do HPLC com detecção por fluorescência, proposto por Guo *et al.*³² foi usado como referência. As condições experimentais do método de referência foram indicadas na seção 3.2.3. A título de ilustração, os

cromatogramas obtidos com o método de referência para as amostras de medicamento contaminados e para a solução padrão de CPT são mostrados na Figura 28.

Amostras dos medicamentos Camptosar (cujo princípio ativo é o CPT-11) e Hycamtin (cujo princípio ativo é o TPT) foram enriquecidas com uma quantidade conhecida do CPT de modo que sua concentração atingisse o valor igual a 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. Para amostras de Camptosar, contendo 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do CPT-11 e 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de CPT, a média de recuperação do CPT foi de 95% <u>+</u> 12% (n = 3) utilizando o método proposto e 104% <u>+</u> 7% (n = 3), utilizando o método de referência (HPLC)³². Para amostras de Hycamtin, contendo 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de TPT e 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de CPT, a recuperação média da CPT foi de 91 <u>+</u> 6% (n=3) usando o método espectrofluorimétrico proposto e 100 <u>+</u> 3% (n=3) usando HPLC. Esses resultados são resumidos na Tabela 8.

Testes de hipóteses foram feitos e os valores para $t_{calculado}$ foram menores que o valor de $t_{crítico}$ (2,228), indicando que não se pode rejeitar a hipótese nula (considerando um nível de confiança de 95%). Portanto, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pela espectrofluorimetria e pelo método cromatográfico usado como referência.

Tabela 8: % de recuperação do CPT 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (contaminante) adicionado aos medicamentos Camptosar (CPT-11 como princípio ativo) e Hycamtin (TPT como princípio ativo)

	% Recuperação (n = 3)	
	Camptosar	Hycamtin
Método fluorimétrico proposto	95 <u>+</u> 12	91 <u>+</u> 6
Método de referência (HPLC)	104 <u>+</u> 7	100 <u>+</u> 3



Figura 28: Cromatogramas obtidos por HPLC (detecção por fluorescência) para o (a) CPT 1 x 10^{-6} mol L⁻¹ e para o (b) CPT em formulação farmacêutica de TPT 5 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) em formulação farmacêutica de CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹.

4.2.2

Método espectrofluorimétrico para determinação de CPT após derivação fotoquímica

4.2.2.1

Estudo das características fluorescentes da camptotecina e de seus derivados após irradiação com UV

Reações fotoquímicas têm sido usadas para aumentar a luminescência de várias substâncias de interesse clínico e biológico tais como antihipertensivos^{117,118}, antimicrobiais¹¹⁹, antidepressivos, e anti-inflamatórios^{120,121}. Tal procedimento pode gerar espécies fotoderivadas com eficiências quânticas fluorescentes maiores que a das moléculas dos analitos originais, melhorando o sinal analítico e, portanto, a sensibilidade das determinações. Além disso, pode ocorrer também a queda ou a eliminação total dos sinais de potenciais interferentes, quando misturas complexas são analisadas.¹²² A derivação fotoquímica é um procedimento simples que evita o uso de agentes químicos derivativos que são geralmente caros e que, muitas vezes contribuem com o aumento do sinal de fundo.¹²³

Conforme já indicado, as características fluorescentes do CPT, do TPT e do CPT-11 são muito similares em solução aquosa na faixa de pH entre 2 e 12. Uma das maneiras de se eliminar as interferências espectrais que impossibilitam a determinação seletiva do CPT é o recurso da derivação fotoquímica. Assim, a fluorescência dos três alcaloides foi estudada após 30 min de exposição de suas soluções à irradiação UV no reator fotoquímico. Para tal, soluções com pH ajustados entre 2 e 12 (tampão Britton-Robinson) foram usadas. Os resultados, mostrados na Figura 29, indicaram comportamentos similares aos obtidos com as soluções não-irradiadas dos alcaloides, com exceção de uma diminuição relativa da fluorescência do CPT e do CPT-11 na faixa de pH acima de 6. Não houve mudanças nos valores de λ_{exc} e de λ_{em} , sendo esse par igual para todos os alcaloides, independente do valor do pH da solução e da exposição prévia ao UV.



Figura 29: Influência do pH e da irradiação UV em soluções de CPT-11, CPT e TPT (todas a 1 x 10^{-6} mol L⁻¹).

Quando o mesmo tipo de estudo foi feito em soluções muito alcalinas (soluções contendo NaOH), notou-se que a fluorescência do CPT sofreu um processo de modificação produzindo um derivado com maior eficiência quântica fluorescente, cujo sinal foi quase dez vezes maior que o observado em solução de NaOH 1 mol L⁻¹ não irradiada. Estudos posteriores indicaram que esse sinal fluorescente do CPT foi máximo no intervalo de exposição ao UV entre 20 e 40 min, como pode ser constatado na Figura 30. Além disso, não houve mudanças significativas nos valores de λ_{exc} (368 nm) e de λ_{em} (450 nm) do CPT em função do tempo de exposição ao UV (Figura 31).

Com relação ainda ao CPT, a influência do meio alcalino no sinal fluorescente medido após exposição ao UV foi estudada usando soluções contendo NaOH entre 0,5 e 2,0 mol L⁻¹. Nesse caso foi verificada uma faixa robusta de sinal máximo entre 1,0 e 2,0 mol L⁻¹ de NaOH (Figura 32).



Figura 30: Influência do tempo de irradiação UV no sinal fluorescente do CPT 5 x 10^{-6} mol L⁻¹



Figura 31: Espectros de excitação e emissão fluorescentes do CPT 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (em NaOH 1,0 mol L⁻¹), após diferentes tempos de irradiação UV, com medições feitas em λ_{exc} = 368 nm e λ_{em} = 450 nm.



Figura 32: Influência da concentração de NaOH na intensidade fluorescente do CPT (1x 10⁻⁶ mol L⁻¹) após 30 min de irradiação UV de suas soluções.

Em contrapartida, a fluorescência do CPT-11 (450/550 nm), que era observada em meio fortemente alcalino, foi praticamente eliminada após 30 min de exposição ao UV, como pode ser observado na Figura 33, que mostra como o sinal do CPT-11 se comporta após permanência no reator fotoquímico no intervalo entre 0 e 150 min. Com relação ao meio alcalino, o sinal do CPT-11 foi completamente eliminado a partir da concentração de NaOH 0,9 mol L⁻¹, como indicado na Figura 34. Estudos para caracterizar estes fotoprodutos são objetos de estudos futuros.

Assim como nas soluções alcalinas não irradiadas, as soluções de TPT previamente submetidas à irradiação UV também não apresentam fluorescência diferente da emitida pelo branco (Figura 34).



Figura 33: Espectros de excitação e emissão fluorescentes do CPT-11 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (em NaOH 1 mol L⁻¹), após diferentes tempos de irradiação UV, com medições feitas em λ_{exc} = 368 nm e λ_{em} = 450 nm.



Figura 34: Influência da concentração de NaOH na intensidade fluorescente do CPT-11 (1x 10^{-6} mol L⁻¹) e do TPT (1x 10^{-6} mol L⁻¹) após 30 min de irradiação UV de suas soluções.

Esses estudos permitiram estabelecer condições de contorno para a determinação seletiva de CPT. Nesse caso, a exposição à radiação UV de soluções fortemente alcalinas promoveram a eliminação de quaisquer interferências espectrais do CPT-11 ou do TPT, dispensando, a princípio, a necessidade de se realizar varredura sincronizada ou derivação de ordem superior dos espectros do CPT. Além disso obteve-se uma relevante amplificação do sinal do CPT em relação à solução não irradiada com UV.

Os espectros de excitação de emissão fluorescentes dos três alcaloides em solução de NaOH 1 mol L⁻¹ após 30 min de exposição ao UV são mostrados na Figura 35. Vale ressaltar que na Figura 34, os espectros obtidos para o CPT-11 e para o TPT são iguais aos da solução de branco.



Figura 35: Espectro de excitação e emissão fluorescentes do (a) CPT (1x 10^{-6} mol L⁻¹); (b) CPT-11 (1 x 10^{-6} mol L⁻¹) e (c) TPT (1 x 10^{-6} mol L⁻¹) depois de 30 minutos de irradiação UV e em solução aquosa de NaOH 1,0 mol L⁻¹.

4.2.2.2 Otimização multivariada das condições experimentais

A fim de otimizar as condições para a determinação seletiva de CPT por espectrofluorimetria após derivação fotoquímica, partiu-se dos estudos univariados de concentração de NaOH e de tempo de exposição ao UV realizados na seção anterior. Assim, um planejamento experimental fatorial foi usado para estabelecer a ordem de importância dos fatores experimentais, para verificar a existência de interação entre esses fatores e para realizar um ajuste final das condições para o método.

A maioria dos experimentos envolve vários fatores, os quais devem ser otimizados e investigados. Sabendo-se disso, o planejamento experimental estatístico (DOE – *design of experiments*) é uma ferramenta usada para conduzir e planejar experimentos a fim de extrair o máximo de informações através do menor número de análises. A idéia básica do DOE é a de elaborar um pequeno conjunto de experimentos, em que todos os fatores pertinentes são variados sistematicamente. A análise estatística posterior dos dados experimentais resultantes (baseando-se na Análise de Variância, ANOVA) permite a identificação das condições ótimas, dos fatores que mais influenciam os resultados e da presença de interações entre esses fatores. Neste trabalho, o tipo de DOE aplicado foi o Planejamento Composto Central ou estrela. A grande

vantagem de um planejamento estrela sobre um planejamento linear é que se leva em consideração a curvatura do modelo sistema ¹²⁴ (ou seja, as interações quadráticas), fato especialmente importante quando se está próximo do máximo verdadeiro.

Um planejamento partindo de um sistema com duas variáveis (tempo UV e concentração de NaOH) é do tipo 2², o que acarreta em um planejamento fatorial em 4 níveis (na forma de um quadrado). Para ajustar melhor um possível comportamento quadrático, aumenta-se a quantidade de níveis no planejamento (mais quatro níveis) girando o quadrado em 45° em relação à orientação de partida. Esse procedimento dobra a quantidade de pontos, no entanto, além desses, se acrescenta um ponto central (0,0) no sistema. Este planejamento também é conhecido como planejamento de corpo central do tipo CCC (do inglês, *Central Composite Circumscribed design*), pois os pontos acrescentados se encontrariam sobre uma circunferência externa ao planejamento quadrado original. A Figura 36 apresenta os pontos do planejamento do tipo CCC com 2 fatores.¹²⁵

Os pontos dos vértices do quadrado original no planejamento são codificados com o número 1 (considerando o lado do quadrado com 2 unidades de comprimento), e cujo sinal (±) varia em função da posição deste no eixo cartesiano. Os pontos referentes aos vértices do quadrado deslocado em 45^{0} , são codificados como $\sqrt{2}$ por estarem a 1,414 unidade do ponto central, As análises foram feitas aleatoriamente, para evitar erros sistemáticos, com uma réplica para cada ponto dos vértices dos quadrados. Quatro replicas foram medidas no ponto central do planejamento, para se estimar a variância característica do experimento. 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 7.0 Statsoft. Com este programa foi possível aplicar o Planejamento Padrão Box Hunter $2^{(k-p)}$, enquanto que para o modelo estatístico o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi o puro erro.

Os experimentos foram realizados conforme as condições indicadas na matriz do planejamento e os sinais fluorescentes obtidos para o CPT colocados na Tabela 10.



Figura 36: Pontos experimentais para o planejamento composto central para o caso de dois fatores.

Tabela 9: Matriz do Planejamento Composto Central indicando níveis (codificados e nãocodificados) e fatores

Nível	UV (min)	[NaOH] mol L ⁻¹
1,414	44,14	1,35
1	40	1,25
0	30	1,00
-1	20	0,75
-1,414	15,86	0,65

	1	2	3
	UV (min)	[NaOH] mol L ⁻¹	Intensidade do sinal fluorescente
1	-1	-1	2700
2	1	-1	2333
3	-1	1	2800
4	1	1	2000
5	0	0	3733
6	0	0	3767
7	0	0	3633
8	0	0	3833
9	1,414	0	2300
10	0	1,414	2133
11	-1,414	0	3367
12	0	-1,414	1500

Tabela 10: Planilha elaborada no programa Statistica 7.0 para o planejamento composto central, considerando os fatores concentração de hidróxido de sódio e tempo de exposição UV na intensidade do sinal fluorescente da camptotecina.

A partir dos resultados, um gráfico da importância dos efeitos (Gráfico de Pareto, mostrado na Figura 37), mostra a relevância estatística da contribuição quadrática de ambos os fatores (UV e [NaOH]), já que as barras correspondentes a estes fatores ultrapassaram a linha tracejada no gráfico (considerando 95% de confiança).

O gráfico de Pareto mostra ainda a relevância da contribuição linear do UV e a pouca relevância da interação entre os dois fatores. Os resultados permitiram também a obtenção da superfície de resposta com curvaturas características das contribuições quadráticas (Figura 38) e de onde já se poderia estimar os valores ótimos para os dois fatores. No entanto, esses valores ótimos foram obtidos a partir da equação do modelo (Equação 16) para o sinal fluorescente máximo (I) usando os valores codificados dos coeficientes gerados (usando coeficientes codificados):

$$I = 3741,48 - 334,52(UV) - 420,70(UV)^{2} - 929,35([NaOH])^{2}$$
(16)

A derivação parcial da Equação 16, primeiro em função do fator UV e depois em função do fator [NaOH], forneceu duas equações que permitiram a solução do sistema e com isso os valores ótimos para os fatores. Esses valores

foram 26 min para o tempo de exposição UV e 1,02 mol L⁻¹ para a concentração de hidróxido. Interessante ressaltar que esses valores ótimos indicados no planejamento experimental foram muito próximos aos encontrados no estudo univariado (vide item 4.2.2.1).



Figura 37: Gráfico de Pareto referente ao Planejamento Composto Central para a derivatização fotoquímica (UV) da camptotecina.



Figura 38: Superfície de resposta para o Planejamento Composto Central para a derivatização fotoquímica (UV) da camptotecina.

4.2.2.3 Testes de interferência

A fim de verificar a viabilidade da aplicação do método analítico em misturas contendo CPT-11 e TPT foram realizados testes de interferência com misturas sintéticas, nos moldes do realizado na seção 4.2.1.1. Assim, a fluorescência de soluções de CPT ($2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) foram comparadas com a fluorescência obtida do CPT ($2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) presente em misturas contendo CPT-11 (I_{CPT}/I_{CPT-11}) ou TPT(I_{CPT}/I_{TPT}), em diferentes razões molares.

Na Tabela 11, os valores das razões entre 0,91 e 1,11 indicaram que não houve nenhuma interferência significativa do CPT-11 ou TPT no sinal fluorescente do CPT. Razões com valores significativamente mais altos do que a unidade implicaram em interferência não espectral no sinal do CPT, isto é, a presença da substância concomitante causou a atenuação da fluorescência do CPT. Para as razões mais baixas do que a unidade, interferência espectral sobre o sinal do CPT é caracterizada.

CPT/TPT	Proporção	$I_{CPT}/I_{(CPT+TPT)}$
(1101 L) 2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁵	1:50	1.07
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁵	1:100	0,79
		,
CPT/CPT-11 (mol L ⁻¹)	Proporção	I _{CPT} /I _(CPT+CPT-11)
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁷	1:1	0,93
2 x 10 ⁻⁷ /4 x 10 ⁻⁷	1:2	0,91
2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁶	1:5	0,97
2 x 10 ⁻⁷ /2 x 10 ⁻⁶	1:10	1,11
2 x 10 ⁻⁷ /1 x 10 ⁻⁵	1:50	1,68

Tabela 11: Estudos de interferência na fluorescência do CPT

I_{CPT}/I_{TPT}. Razão entre a intensidade fluorescente de solução padrão de CPT e a intensidade fluorescente de solução padrão de TPT, ambas em NaOH 1,0 mol L⁻¹ e irradiadas por 26 min.

 I_{CPT}/I_{CPT-11} – Razão entre a intensidade fluorescente de solução padrão de CPT e a intensidade fluorescente de solução padrão de CPT-11, ambas em NaOH 1,0 mol L⁻¹ e irradiadas por 26 min.

Os resultados da Tabela 11 mostraram que não foram encontradas interferências na fluorescência do CPT em misturas contendo até 50 vezes mais TPT (CPT:TPT, 1:50). A comparação entre os espectros de excitação e de

emissão fluorescentes do padrão de CPT e os obtidos na mistura CPT/TPT (1:50) pode ser visualizada na Figura 39. Como o valor da razão I_{CPT}/I_{TPT} foi igual a 0,79 para misturas CPT:TPT 1:100, concluiu-se que há interferência espectral do TPT neste caso.

Para as misturas que continham CPT-11, a proporção máxima de CPT:CPT-11 permitida sem que houvesse interferência espectral do CPT-11 no sinal fluorescente do CPT foi de 1:10 (CPT:CPT-11), igual ao obtido para o método espectrofluorescente baseado na derivação de segunda ordem dos espectro de excitação do CPT em NaOH 1 mol L⁻¹ (sem irradiação UV das soluções dos analitos). Os espectros da Figura 40 mostram a similaridade entre os espectros fluorescentes do CPT na solução padrão e na mistura sintética CPT/CPT-11 (1:10). Em misturas CPT:CPT-11 1:50, a atenuação da fluorescência do CPT é grande, o que pôde ser constatado pelo valor I_{CPT}/I_{CPT-11} igual a 1,68.



Comprimento de onda (nm)

Figura 39: Bandas de fluorescência de soluções alcalinas de (a) CPT (2×10^{-7} mol L⁻¹), (b) mistura CPT:TPT (2×10^{-7} mol L⁻¹ : 1×10^{-5} mol L⁻¹), e de (c) TPT (1×10^{-5} mol L⁻¹) após 26 minutos de irradiação UV.



Figura 40: Bandas de fluorescência de soluções alcalinas de (a) CPT (2×10^{-7} mol L⁻¹), (b) da mistura CPT:CPT-11 (2×10^{-7} mol L⁻¹ : 2×10^{-6} mol L⁻¹) e do (c) CPT-11 (2×10^{-6} mol L⁻¹) após 26 minutos de irradiação UV.

Um resumo das condições experimentais para determinação seletiva de CPT na presença de CPT-11 e de TPT usando derivação fotoquímica é mostrado na Tabela 12.

Tabela 12: Resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação espectrofluorimétrica do CPT em misturas com CPT-11 ou com TPT submetidas à irradiação UV.

Derivados	TPT	CPT-11
CPT:derivado	1:50	1:10
Solvente	Solução aquosa de NaOH 1,0 mol L ⁻¹	Solução aquosa de NaOH 1,0 mol L ⁻¹
Tempo de irradiação UV (min)	26	26
λ_{exc} / λ_{em} (nm)	368 / 450	368 / 450
Tipo de varredura	normal	normal

4.2.2.4

Parâmetros Analíticos de Mérito do método espectrofluorimétrico para o CPT após derivação fotoquímica

Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos para o CPT nas condições estabelecidas para a sua determinação após derivação fotoquímica, na presença de CPT-11 ou de TPT.

Para a obtenção dos parâmetros relacionados com a resposta linear, três Curvas analíticas foram construídas usando as condições experimentais otimizadas e indicadas na Tabela 12. Cada ponto da curva foi o resultado médio de três medições de fluorescência e a melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada com ajuda do método do programa Origin 6.0.

Os resultados permitiram verificar uma faixa de resposta linear que se estendeu de 1,0 x 10^{-7} a 1,0 x 10^{-5} mol L⁻¹ caracterizada pelo valor de r² igual a 0,9989 (Figura 41). O comportamento homoscedástico foi confirmado através do gráfico de resíduos (Figura 42).



Figura 41: Curva analítica para o CPT em NaOH 1,0 mol L⁻¹ e após 26 min de irradiação UV, obtida através de varredura normal (λ_{exc} / λ_{em} = 368 / 450 nm).



Concentração de CPT (mol L-1)

Figura 42: Gráfico de resíduos para as determinações fluorimétricas de CPT em NaOH 1,0 mol L^{-1} e após 26 min de irradiação UV.

A precisão foi avaliada em termos da repetitividade das medições usando soluções de CPT (em NaOH 1 mol L⁻¹) na concentração de 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ irradiadas por 26 min. O resultado obtido por meio de 10 experimentos consecutivos produziu um desvio padrão de 1,8%, o que pode ser considerado muito bom ao se considerar a etapa de tratamento fotoquímico da amostra. A detectabilidade do método foi avaliado pelos valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando os critérios definidos anteriormente. Os resultados ficaram na ordem de 10⁻¹⁰ e 10⁻⁹ mol L⁻¹, uma ordem de grandeza a menos do que a encontrada para a determinação fluorimétrica de CPT sem o artifício da derivatização fotoquímica (Tabela 6). Os parâmetros de mérito obtidos podem ser visualizados na Tabela 13.

Condições da medição	Espectro de varredura normal
λ	450 nm
Equação da curva (limite de confiança de 95%)	$y = 3,01 \times 10^9 x + 664,06$
r ²	0,9989
Precisão ^a	9,7 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ (1,8%)
Limite de detecção ^b (3s _b)	8,0 x 10 ⁻¹⁰ mol L ⁻¹
Limite de quantificação ^b (10s _b)	2,7 x 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹

Tabela 13: Parâmetros Analíticos de Mérito encontrados para o CPT em condições otimizadas para a sua determinação na presença de CPT-11 ou TPT após irradiação UV.

^a Precisão calculada pela repetitividade tendo CPT na concentração de 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹

^b Limite de detecção e limite de quantificação baseados no desvio padrão (S_b) de 10 leituras da menor concentração de CPT que se consegue ler na curva analítica. Este S_b é multiplicado por 3 para o LD e por 10 para o LQ.

A robustez, definida como a capacidade de um método não ser afetado por uma pequena modificação de seus parâmetros, foi avaliada através do estudo da influência do tempo de irradiação UV no sinal fluorescente do CPT, o que já foi demonstrado no detalhe da Figura 30, cujos resultados indicaram que o método é robusto compreendendo a faixa de tempo que vai de 25 a 40 min de irradiação UV.

4.2.2.5

Cálculo da incerteza associada à medição da fluorescência da CPT após derivação fotoquímica

Os mesmos grupos de fontes relevantes de incerteza citados anteriormente foram usadas nesse estudo: i) repetitividade (u_r) , ii) reprodutibilidade (u_R) , iii) curva analítica (u_{curva}) e iv) preparo das soluções padrão (u_s) . Vale lembrar que cada grupo deste será brevemente comentado abaixo, mas maiores detalhes sobre cada um deles serão discutidos no Capítulo 6.

O valor de u_r foi avaliado pela variação estatística das medições sequenciais de fluorescência (n=10) de solução padrão de CPT 5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ preparada em meio alcalino e irradiada com UV. O valor encontrado foi de 9,65 x 10⁻⁸ mol L⁻¹. Para u_R , o valor de 9,77 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ foi encontrado. Nesse caso,

as medições de sinal foram feitas por dois analistas diferentes, onde cada um obteve um conjunto de 10 medições das soluções fotoderivatizadas de CPT 5 x 10^{-6} mol L⁻¹. Para u_s, levou-se em consideração as etapas e as incertezas dos aparatos usados na preparação das soluções de CPT 5 x10⁻⁶ mol L⁻¹. Diferentemente da avaliação feita para os métodos sem derivação fotoquímica, nesse caso, duas estratégias de preparação de solução foram feitas: uma por ajuste de volume da solução de trabalho e outra por ajuste de massa da solução de trabalho (considerando μ_{aqua} = 1,0003 g cm⁻³ e $d_{(NaOH 1 mol L^{-1})} = 1,0323 \text{ g cm}^{-3} \text{ a } 20 \text{ °C}$). Os valores obtidos foram 2,17 x10⁻⁶ mol L⁻¹ para as soluções ajustadas por volume e 2,87 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ para soluções ajustadas com medição de massa, ou seja, duas ordens de grandeza menor do que o resultado obtido com o preparo das soluções por avolumação. Para os cálculos da u_{curva} (2,48 x 10⁻⁷ mol L⁻¹), a fluorescência de cada um dos padrões de CPT (de 1 x 10^{-7} a 1 x 10^{-5} mol L⁻¹) da curva analítica foi medida em triplicata.

A incerteza combinada (u_c), obtida pela soma quadrática de todas as contribuições de incerteza relativas à medição da fluorescência do CPT foi de 2,19 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e 2,87 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ respectivamente para os casos do preparo das soluções por ajuste de volume e por ajuste por massa. Portanto, a incerteza expandida (k=2;95%) obtida foi de 4,39 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, na qual a fonte de contribuição mais relevante foi a proveniente do preparo de soluções por ajuste de volume (2,17 x 10⁻⁶ mol L⁻¹); mas quando a solução foi preparada por ajuste de massa da amostra e solvente, a incerteza combinada (u_s) foi de 2,87 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ e a expandida (U) foi de 5,70 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, o que equivale a 11% da concentração nominal do CPT (5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹).

Os resultados para cada fonte de incerteza assim como os valores das incertezas combinada e expandida são indicados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de incerteza calculados para o método fluorimétrico utilizado na determinação de CPT na presença de CPT-11 ou TPT após irradiação UV.

Fontes de incerteza	Valor da incerteza (mol L ⁻¹)		
Repetitividade (u _r)	9,65	5 x 10 ⁻⁸	
Reprodutibilidade (u _R)	9,77	7 x 10 ⁻⁸	
Curva analítica (u _{curva})	2,48	8 x 10 ⁻⁷	
Preparo da solução (u _s)	2,17 x10 ^{-6 (a)}	2,87 x 10 ^{-8 (b)}	
Incerteza combinada (u _c)	2,19 x 10 ⁻⁶	2,85 x 10 ⁻⁷	
Incerteza expandida* (U)	4,39 x 10 ⁻⁶	5,70 x 10 ⁻⁷	

^(a) Soluções preparadas por ajuste de volume

^(b) Soluções preparadas por ajuste de massa de amostras, padrões e solventes

4.2.2.6

Testes de recuperação em formulações farmacêuticas e comparação com método analítico de referência

O desempenho do método espectrofluorimétrico usando derivatização fotoquímica foi avaliado por meio de testes de recuperação em formulações farmacêuticas fortificadas com CPT, simulando uma contaminação. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com os obtidos com o método baseado no uso do HPLC com detecção de fluorescência, proposto por Guo *et al*³².

Amostras dos medicamentos Camptosar (cujo princípio ativo é o CPT-11) e Hycamtin (cujo princípio ativo é o TPT) foram enriquecidas com uma quantidade conhecida (1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹) de CPT. Para amostras de Camptosar, contendo 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do CPT-11 e 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de CPT, a média de recuperação do CPT foi de 101% \pm 7% (n = 3) utilizando o método proposto para as determinações de CPT na presença de CPT-11 (Tabela 12), e 93% \pm 5% (n = 3) utilizando o método de referência (HPLC). Para amostras de Hycamtin, contendo 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de TPT e 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de CPT, a recuperação média da CPT foi de 103 \pm 8% (n=3) usando o método espectrofluorimétrico proposto para as determinações de CPT na presença de TPT (Tabela 12), e 111 \pm 4% (n=3) usando o método de referência por HPLC. Esses resultados são resumidos na Tabela 15. A análise de variâncias indicou que as recuperações médias encontradas para cada amostra estavam estatisticamente dentro do limite de confiança de 95%, indicando a validade do método espectrofluorimétrico proposto.

Tabela 15: Taxa de recuperação do CPT 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (contaminante) adicionado aos medicamentos Camptosar (CPT-11 como princípio ativo) e Hycamtin (TPT como princípio ativo)

	% Recuperação (n = 3)		
Medicamento	Camptosar	Hycamtin	
Método fluorimétrico proposto	101 <u>+</u> 7	103 <u>+</u> 8	
Método de referência (HPLC)	93 <u>+</u> 5	111 <u>+</u> 4	

4.3 Método para determinação simultânea de CPT, CPT-11 e TPT por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

4.3.1

Otimização dos parâmetros críticos para separação eletroforética na fase pseudoestacionária

Para a otimização do método de separação e quantificação do CPT e derivados por MEKC, inicialmente foi feito um estudo univariado dos parâmetros considerados principais na constituição do eletrólito de trabalho (BGE), da solução da amostra e dos parâmetros instrumentais. No caso do BGE, foram avaliados a concentração e pH tampão borato, a concentração do surfactante usado como fase pseudoestacionária (no caso o SDS) e quantidade de modificador orgânico (acetonitrila). O parâmetro instrumental otimizado foi a temperatura, pois o potencial aplicado foi mantido em 25 kV. O tempo e a pressão de injeção também foram fixados nesse primeiro momento, porém ajustes desses parâmetros e também da composição da solução da amostra no capilar.

Para finalizar a otimização com base nos estudos univariados, um planejamento fatorial, usando três parâmetros (fatores) mais críticos, foi empregado para conseguir o ajuste final das melhores condições para o método.

4.3.1.1 Estudos univariados

Separações em cromatografia eletrocinética resultam de diferenças na mobilidade eletroforética dos analitos, assim como de diferenças na distribuição das espécies entre a solução do eletrólito e a fase pseudoestacionária. Como todas as moléculas neutras têm a mesma velocidade eletroforética, a fase pseudoestacionária é importante para produzir as diferenças no tempo de migração dos analitos. Por isso, a primeira decisão foi selecionar o surfactante mais apropriado para constituir a fase micelar. Esta escolha implica em definir a natureza físico-química das micelas e, portanto, a seletividade. Para este trabalho foi escolhido o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) por ter boa solubilidade em água, por ser uma substância estável, por produzir facilmente micelas estáveis e por ser amplamente usado na literatura para a separação eletroforética de um grande número de substâncias.

A seletividade da cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) é dependente de um grande número de fatores. Logo, a otimização da resolução dos picos por MEKC pode seguir vários caminhos. Por isso, Nursten¹⁰⁸ sugere em seu livro algumas condições iniciais a serem seguidas no início de um desenvolvimento de método por MEKC. Assim, já tendo definido a fase pseudoestacionária (SDS), decidiu-se também um sistema constituído por tampão de borato, contendo acetonitrila como modificador químico. Para os experimentos de otimização foram usadas soluções aquosas de TPT (2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), CPT (1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e CPT-11 (1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). As soluções de TPT e CPT-11 foram preparadas em água ultrapurificada, enquanto o CPT foi preparado em MeOH:água ultrapurificada 30:70 v/v. Vale salientar que pelo fato do TPT ter uma absorvância relativamente mais baixa, a concentração utilizada deste analito foi vinte vezes maior que a dos outros dois. Os testes foram realizados com potencial aplicado fixa em 25 kV e com injeções hidrodinâmicas de 15 s com pressão de 50 mbar. O monitoramento dos sinais dos analitos foi feito pela medição da absorvância em 368 nm, escolha essa baseada na avaliação dos espectros de absorção dos três alcaloides (Figura 43).



Figura 43: Espectros de absorção da (a) TPT; (b) CPT e (c) CPT-11.

Um breve estudo preliminar indicou que uma boa separação dos analitos poderia ser feita na faixa de pH do tampão borato entre 8 e 9 com acetonitrila como modificador químico (Figura 44). Nessas condições os picos dos analitos surgiram na seguinte ordem crescente de tempos de migração: TPT, CPT e CPT-11.



Figura 44: Efeito do pH 8,0–10,0 na separação e nos tempos de migração dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC, usando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ contendo acetonitrila 5% v/v, com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

Assim, a primeira otimização, a da concentração de SDS, foi realizada com tampão de borato ($2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com pH ajustado em 8,2 contendo acetonitrila (5% v/v). As concentrações de SDS foram variadas entre 1 x 10^{-2} e 6 x 10^{-2} mol L⁻¹. Verificou-se que a melhor separação foi obtida com o BGE contendo SDS na concentração de 5 x 10^{-2} mol L⁻¹. Em concentrações de SDS maiores ou menores que esta, a qualidade da separação e os formatos dos picos ficaram prejudicados. A Figura 45 mostra este resultado, além de indicar que o EOF também é afetado, pois quanto maior a concentração do surfactante maior o tempo de migração (diminuição do EOF).

140



Figura 45: Efeito da concentração de SDS na separação e nos tempos de migração (ordem crescente)dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC, usando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹(pH 8,2) contendo acetonitrila 5% v/v e com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

A influência da temperatura do sistema também foi considerada. A temperatura afeta a viscosidade do tampão e, consequentemente, altera o EOF e o tempo de migração. Temperaturas mais elevadas diminuem a viscosidade do BGE, diminuindo os tempos de migração. Em contrapartida, temperaturas mais elevadas podem provocar alargamento das bandas e degradação dos analitos, o que são efeitos negativos.

Com o intuito de verificar o efeito da temperatura do sistema na qualidade da separação e do formato dos picos, valores entre 25 e 40°C foram testados. A menor temperatura (25 [°]C) testada produziu melhor simetria, formato e resolução entre os picos, embora com tempos de migração um pouco maiores (Figura 46). No entanto, como o tempo de migração máximo foi abaixo de 10 min, o uso de 25 [°]C foi considerado satisfatório.



Figura 46: Efeito da temperatura na separação e nos tempos de migração (ordem crescente) dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC, usando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ (pH 8,2) contendo SDS 5 x 10^{-2} mol L⁻¹ e acetonitrila 5% v/v, com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

A partir desses primeiros resultados, o ajuste final do tampão borato foi realizado com um estudo mais detalhado do efeito do pH e da concentração do tampão. Quando estas condições do tampão não são ajustadas, separações insatisfatórias, longos tempos de migração, assimetria dos picos e linhas de base com muito ruído são observadas. O valor do pH do BGE tem uma forte influência na separação dos analitos, pois influencia tanto a mobilidade eletroforética dos analitos (equilíbrio entre analito e fase pseudoestacionária) quanto a mobilidade do fluxo eletro-osmótico (o aumento do pH do tampão causa a diminuição da mobilidade do EOF). Por outro lado, a concentração do tampão pode afetar a magnitude do EOF e influencia a simetria dos picos dos analitos, pois se a concentração dos analitos é alta em relação aos íons do tampão, o campo elétrico no capilar pode tornar-se distorcido, acarretando a formação de picos irregulares.

Primeiramente, o estudo mais detalhado do pH foi realizado usando os valores otimizados de SDS e temperatura. Valores de pH entre 8 e 10 foram usados. Na Figura 47, os eletroferogramas obtidos em intervalos de pH de 0,1 unidade entre 8,4 e 9,5 são apresentados. Observa-se excelente separação com

valores entre 8,5 e 9,0, no entanto, dentro desta faixa, os maiores tempos de migração foram obtidos com valores de pH 8,9 e 9,0. Assim, BGE com pH ajustado em 8,8 foi escolhido para o trabalho.



Figura 47: Efeito do pH 8,4 a 9,5, na separação e nos tempos de migração dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC, usando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ contendo acetonitrila 5% v/v, com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

Com o valor de pH ajustado em 8,8, o efeito da concentração de ácido bórico foi testado na faixa de 1 x 10^{-2} a 4 x 10^{-2} mol L⁻¹. Os melhores resultados em termos de tempo de análise, resolução e estabilidade da corrente gerada em função da potencial aplicado (em torno de 48 µA) foram obtidos com a concentração de ácido bórico de 1 x 10^{-2} (neste valor o pico do TPT fica dividido) e 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ (Figura 48), sendo esse último valor o escolhido para a continuidade do trabalho.



Figura 48: Efeito da concentração de ácido bórico (pH 8,8) contendo SDS 5 x 10^{-2} mol L⁻¹ e acetonitrila 5% (v/v), com temperatura do sistema igual a 25°C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, na separação e nos tempos de migração (em ordem crescente) dos picos do (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC.

Solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila podem ser usados no BGE como modificadores químicos para alterar o tempo de retenção dos analitos pela fase micelar. Inicialmente já se havia constatado a necessidade do uso da acetonitrila para proporcionar resolução entre os picos dos analitos quando do uso do tampão borato. Para avaliar o efeito da acetonitrila na qualidade da separação eletroforética, variou-se a quantidade desse modificador orgânico entre 0 a 15% v/v. Os resultados indicaram que o melhor desempenho entre tempo máximo de migração e resolução dos picos foi obtido com BGE contendo 7,5% de acetonitrila. Com quantidades menores deste modificador orgânico, os tempos de migração foram mais curtos, mas a resolução dos picos dos analitos não ficou adequada. A separação feita com quantidades de acetonitrila maiores que 7,5% (v/v), além de não proporcionar melhoras na resolução, os tempos de migração foram maiores por causa da redução do EOF pelo modificador orgânico. Os eletroferogramas obtidos neste estudo estão indicados na Figura 49.



Figura 49: Efeito do percentual de acetonitrila na separação e nos tempos de migração dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ por MEKC, usando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ (pH 8,8), contendo SDS 5 x 10^{-2} mol L⁻¹, com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

Um resumo das condições otimizadas (pelo estudo univariado) para a separação de TPT, CPT e CPT-11 encontra-se na Tabela 16. Nessas condições, a ordem crescente dos tempos de migração dos analitos foi TPT, CPT e CPT-11. A Figura 50 mostra a ordem de migração dos analitos cujas características como tempo de migração, simetria de pico e resolução são mostradas na Tabela 17.

Cista ma ta ma ã a	Ácido bórico	2 x 10 ⁻² mol L ⁻¹
	рН	8,8
Sistema tampao	Surfactante (SDS)	5 x 10 ⁻² mol L ⁻¹
	Modificador orgânico (ACN)	7,5% v/v
	Temperatura do sistema	25 °C
	Potencial aplicado	25 kV
Parâmetros instrumentais*	Tempo de injeção hidrodinâmica	15 s
	Pressão	50 mbar
	Comprimento de onda (λ)	368 nm

Tabela 16: Condições otimizadas univariadamente para a separação do TPT, CPT e CPT-11 por MEKC

*Estes parâmetros foram mantidos constantes durante todo o estudo univariado.



Figura 50: Sobreposição dos eletroferogramas da mistura TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹ : CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ : CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹, assim como de cada uma das soluções dos analitos separadamente e nas mesmas concentrações da mistura, todas em pH original, utilizando tampão de borato 2 x 10^{-2} mol L⁻¹ (pH 8,8) contendo SDS 5 x 10^{-2} mol L⁻¹ e acetonitrila 7,5% v/v, com temperatura do sistema igual a 25° C, potencial de 25 kV e 15 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar.

A eficiência (N) expressa o número de pratos teóricos e largura do pico na altura da linha de base (W) e pode ser calculada utilizando o tempo de migração, segundo a Equação 17:

$$N=16(t_m/w)^2$$
 (17)

onde t_m é o tempo de migração e w é a largura do pico na altura da linha de base. Conforme esperado, a TPT apresenta um número de pratos teóricos menor e é a primeira a eluir. Analogamente, como a irinotecana é a última, apresenta um número de pratos teóricos maior (Tabela 17).

Picos simétricos são obtidos quando a mobilidade dos analitos dentro do capilar é próxima a mobilidade do tampão. Outro fator que influencia na simetria é a concentração do tampão, se a concentração dos analitos é alta em relação aos íons do tampão o campo elétrico no capilar pode ser distorcido o que leva a picos irregulares. Para obter melhores resoluções e formato do pico, a concentração do tampão deve se aproximadamente 100 vezes maior que a concentração de analito injetada⁹⁹. Na Tabela 17 os valores de simetria dos

picos ficaram em torno de um valor ideal (1,0), o que indica um bom resultado ao longo das análises. A resolução foi calculada pela Equação 18, na qual se utilizou o critério da largura do pico a meia altura.¹²⁶

$$R = 1,176 \left\{ \frac{(t_1 - t_2)}{w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)}} \right\}$$
(18)

onde: $t_1 e t_2$ são os tempos de migração dos analitos 1 e 2, $w_{1(1/2)} e w_{2(1/2)}$ são as larguras dos picos 1 e 2 calculadas a meia altura e 1,176 é o fator de multiplicação. A resolução entre os picos referentes ao TPT e ao CPT foi de 20,53 <u>+</u> 0,37 e entre os picos do CPT e CPT-11 a resolução foi de 14,56 <u>+</u> 0,52 (Tabela 17), esses valores indicam uma resolução excelente entre os picos, pois o valor considerado como ótimo é igual a 1,5.¹²⁶

Tabela 17: Características do TPT, CPT e CPT-11 quanto ao tempo de migração, eficiência, simetria de pico e resolução por MEKC.

Analitos	Tempo de migração (min)	Eficiência	Simetria	Reso	lução
TPT	6,52 <u>+</u> 0,31	105613	0,99 <u>+</u> 0,08	TPT-CPT	CPT-CPT-11
CPT	7,90 <u>+</u> 0,49	130192	1,02 <u>+</u> 0,05	20,53 <u>+</u> 0,37	14,56 <u>+</u> 0,52
CPT-11	9,06 <u>+</u> 0,63	133671	1,08 <u>+</u> 0,14		

4.3.1.2 Planejamento experimental

A partir do estudo univariado, escolheu-se três fatores críticos para a realização de um estudo multivariado: (i) concentração de SDS, (ii) quantidade de acetonitrila e (iii) concentração do tampão borato pH 8,8. A partir desse estudo multivariado, um ajuste fino das condições experimentais é feito através da verificação de interações sinérgicas ou antagônicas entre esses fatores.

O planejamento experimental escolhido foi o planejamento composto central com três fatores 2^3 , cujo *design* pode ser visualizado como dois cubos de mesmo volume, sendo um deles deslocado espacialmente de forma que suas arestas se posicionam no centro da face do outro. Com isso, tem-se oito pontos nos vértices do primeiro cubo (codificados pelo número 1, com sinal (±) indicado pela posição do ponto no plano cartesiano) e oito pontos axiais que são os vértices do cubo deslocado (cujo fator representado pelo eixo é codificado por 1,682 ($(2^3)^{1/4}$) também com sinal (±) indicado pela posição do ponto no plano cartesiano e que indica a distância relativa do ponto axial em relação ao ponto central, quando se leva em consideração que a aresta do cubo tem 2 unidades de comprimento). Além disso, tem-se o ponto central (0,0,0) onde a realização de uma série de replicas permite se obter a estimativa da variância do experimento (Figura 51).

Para início do processo, estabeleceu-se os pontos "0" para cada fator, como indicado a seguir: 4 x 10^{-2} mol L⁻¹ (40 mmol L⁻¹) de SDS; 3 x 10^{-2} mol L⁻¹ (30 mmol L⁻¹) de concentração do tampão borato (concentração de H₃BO₃ usado na preparação do tampão) e 6%, em volume, de acetonitrila. O valor de 10 mmol L⁻¹ foi estabelecido como o deslocamento de uma unidade para concentração de SDS e concentração de H₃BO₃ e o valor de 1% foi estabelecido como deslocamento de uma unidade para quantidade do modificador orgânico. Um esquema para os valores codificados e os respectivos valores reais para cada fator são indicados na Tabela 18.



Figura 51: Planejamento composto central para três fatores. Os pontos das arestas do cubo são os ensaios de um fatorial 2^3 e os círculos fora do cubo representam a parte em estrela.

Parâmetros	-1,682	-1	0	+1	+1,682
[SDS] (mmol L ⁻¹)	-6,82 (23,18	-10	+10	50	+6,82
$[H_3BO_3]$ (mmol L ⁻¹)	-6,82 (13,18	-10 20	+10	40	+6,82
% ACN (v/v)	-1, 682 (4,32	1 5	+1	7	+1, 682

Tabela 18: Codificação dos fatores (variáveis).

A Tabela 19 apresenta a matriz planejamento codificada para este trabalho, gerada através do programa Statistica 7.0. Cada linha da matriz de planejamento corresponde a uma corrida experimental, que foi realizada com as variáveis assumindo o seu valor correspondente (indicadas na quarta coluna). O parâmetro avaliado foi o tempo de migração. No entanto, o uso do capilar ao longo do dia produz pequenas variações sistemáticas nos tempos de migração. Porém, a diferença de tempo entre cada pico não oscila muito. Por isso, as respostas de cada ponto do planejamento foram analisadas em termos de diferença de tempo entre os picos do TPT-CPT e do CPT-CPT-11. Os dados e os resultados dos tempos de separação podem ser vistos na Tabela 20.

	[SDS] (mmol L ⁻¹)	[H ₃ BO ₃] (mmol L ⁻¹)	%ACN (v/v)	([SDS], [H ₃ BO ₃], %ACN)
Central	0	0	0	(40; 30; 6)
1	-1	-1	-1	(30; 20; 5)
2	-1	-1	+1	(30; 20; 7)
3	+1	-1	-1	(50; 20; 5)
4	-1	+1	+1	(30; 30; 7)
5	-1	+1	-1	(30; 40; 5)
6	+1	+1	+1	(50; 40; 7)
7	+1	-1	+1	(50; 20; 7)
8	+1	+1	-1	(50; 40; 5)
9	0	+1,682	0	(40; 46,82; 6)
10	0	-1,682	0	(40; 13,18; 6)
11	+1,682	0	0	(56,82; 30; 6)
12	-1,682	0	0	(23,18; 30; 6)
13	0	0	+1,682	(40; 30; 7,7)
14	0	0	-1,682	(40; 30; 4,3)

Tabela 19: Matriz de planejamento experimental, gerada através do programa Statistica.

	[SDS]	[H ₃ BO ₃]	%ACN	Tempo TPT-CPT	Tempo CPT-CPT11
	mmol L ⁻¹	_mmol L ⁻¹		(min)	(min)
1	30,0	20,0	5,00	1,00	1,40
2	30,0	20,0	7,00	1,70	2,30
3	30,0	40,0	5,00	1,20	1,40
4	30,0	40,0	7,00	1,60	2,20
5	50,0	20,0	5,00	1,20	1,20
6	50,0	20,0	7,00	2,00	2,30
7	50,0	40,0	5,00	1,30	1,10
8	50,0	40,0	7,00	1,90	1,90
9	23,2	30,0	6,00	1,30	2,30
10	56,8	30,0	6,00	1,60	1,40
11	40,0	13,2	6,00	1,30	1,40
12	40,0	46,8	6,00	1,50	1,80
13	40,0	30,0	4,32	1,00	1,30
14	40,0	30,0	7,68	1,60	2,00
15 (C)	40,0	30,0	6,00	1,70	1,80
16 (C)	40,0	30,0	6,00	1,10	1,40
17 (C)	40,0	30,0	6,00	1,20	1,90
18 (C)	40,0	30,0	6,00	1,20	1,60

Tabela 20: Dados experimentais e resultados

Os gráficos de Pareto (Figura 52 e Figura 53), obtidos a partir dos resultados do planejamento, mostram que o valor estatisticamente mais relevante foi a quantidade de acetonitrila (apontada pela barra que cruzou a linha tracejada do gráfico, significando que o resultado não está dentro do nível de 95% de confiança). Os gráficos de Pareto também indicaram que não existe interação relevante entre fatores e descartou a relevância da influência quadrática dos mesmos. Sendo assim, o único ajuste a ser feito é um aumento da quantidade de acetonitrila. Os resultados do planejamento sinalizaram também a robustez e a adequação da escolha dos valores de 2 x 10⁻² mol L⁻¹ para a concentração de tampão e 5 x 10^{-2} mol L⁻¹ para concentração de SDS. Com relação à concentração de acetonitrila, o valor de t indicado na barra indica que o ajuste deveria ser feito com o aumento da quantidade do modificador orgânico. Como não foi verificada interação desse fator com os outros dois, a escolha da quantidade ótima pôde ser justificada pelo experimento univariado, isto é, 7,5% de acetonitrila. Assim o planejamento experimental corrobora os parâmetros experimentais escolhidos na Tabela 16.



Efeitos estimados (valor absoluto)

Figura 52: Gráfico de Pareto referente ao tempo de separação entre os picos do TPT-CPT.



Efeitos estimados (valor absoluto)

Figura 53: Gráfico de Pareto referente ao tempo de separação entre os picos do CPT-CPT11.

4.3.2 Pré-concentração em linha

Uma das principais desvantagens do uso da fotometria de absorção como método de detecção em eletroforese capilar é a baixa sensibilidade, resultante das pequenas dimensões da coluna de separação (caminho óptico do capilar) e do pequeno volume de amostra. Uma das formas de se melhorar a sensibilidade da detecção é por meio de processos de pré-concentração no capilar usando a técnica denominada "empilhamento" (acumulação da amostra dentro de uma pequena zona do capilar). Como já discutido anteriormente, as duas formas de empilhamento mais comumente utilizadas são: modo normal de empilhamento (NSM) e modo de empilhamento onde se aplica inversão da polaridade do eletrodo (REPSM). Neste trabalho foi usado o NSM por se tratar de um procedimento mais simples, porém eficaz, podendo provocar a redução em pelo menos uma ordem de grandeza na concentração característica do limite de detecção.

No NSM, a pré-concentração ocorre devido ao aumento do tempo de injeção hidrodinâmica da amostra para o interior do capilar cheio com o eletrólito de corrida. Nesse caso a condutividade do eletrólito de corrida deve ser mais alta que a da solução de amostra. Quando a diferença de potencial é aplicada para que ocorra a eletroforese, gera-se uma diferença de condutividade entre os meios (eletrólito de corrida e amostra) dentro do capilar, fazendo com que a força do campo elétrico seja maior na região da amostra do que no resto do capilar. Os analitos da amostra irão se mover com maior velocidade do que os íons inseridos na região de alta condutividade e, ao atingirem a região de baixo campo elétrico (região do tampão de corrida) sua velocidade diminui, ocorrendo assim o empilhamento dos analitos no eletrólito de corrida. Portanto, para este método é necessária a escolha e a otimização de uma matriz de baixa condutividade, onde os analitos serão dissolvidos. Por isso, soluções de TPT, CPT e CPT-11 foram preparadas em água ultrapurificada:tampão borato 2×10^{-2} mol L⁻¹ (pH 8,8) nas seguintes proporções (v/v): 1:1; 1:3; 3:1. O mesmo foi feito também em SDS:tampão borato (2 x 10⁻² mol L⁻¹, pH 8,8) e acetonitrila:tampão borato (2 x 10⁻² mol L⁻¹, pH 8,8), ambas na proporção 1:1 v/v. O melhor resultado em termos de sinal analítico foi obtido com preparação dos padrões em água ultrapurificada: tampão borato (2 x 10^{-2} mol L⁻¹, pH = 8,8) 1:3 v/v. Para os demais casos, a qualidade dos picos e da separação ficou prejudicada.

Após a otimização da matriz de baixa condutividade, a influência do tempo de injeção hidrodinâmica da amostra (tempos entre 15 e 90 s) foi estudada (Figura 54). Como era esperado, com maiores tempos de injeção, as áreas dos picos aumentaram; no entanto, a eficiência da separação diminuiu. Sendo assim, a injeção no tempo de 75 s foi escolhida como o melhor, pois se obteve separação de todos os picos em corridas de menos de 10 min. A ordem de migração dos picos não foi alterada, porém os tempos de migração sofreram algumas modificações, mas que foram insignificantes: topotecana (4,3 min), camptotecina (4,6 min) e irinotecana (8,3 min).



Figura 54: Influência do tempo de injeção hidrodinâmica na separação dos picos de (a) TPT 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, (b) CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e (c) CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ sob as condições otimizadas (Tabela 22).

Na tentativa de amplificar ainda mais os sinais dos analitos, e consequentemente melhorar a sensibilidade do método, utilizou-se uma cela com caminho óptico alongado (Figura 16) cujo objetivo era aumentar caminho óptico da detecção em dez vezes. Em conjunto com a pré-concentração NSM, esperava-se obter uma grande amplificação de sinal dos analitos, o que seria bem vindo especialmente no caso do TPT, cujo sinal é bem mais baixo que o dos outros dois analitos. Assim, o uso da cela e a aplicação do NSM provocaram um aumento nas áreas do TPT, CPT e CPT-11 da ordem respectivamente de 28,

63 e 76 vezes (Figura 55), quando comparadas ao método no qual é usado somente o alinhador convencional e a injeção de 15 s (normal). Na Tabela 21, esses resultados são esquematizados e na Tabela 22 estão indicadas as condições finais otimizadas para o método de determinação de CPT e derivados por MEKC usando também o artifício do empilhamento (NSM) em conjunto com a cela de caminho óptico alongado.



Tempo (min)

Figura 55: Influência do uso da cela de caminho óptico alongado em conjunto com NSM na amplificação das áreas dos picos da topotecana 2 x 10^{-4} mol L⁻¹, camptotecina 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e irinotecana 1 x 10^{-5} mol L⁻¹, utilizando tempo de injeção de 75 s.

Tabela 21: Resultados que indicam a vantagem do uso da cela de caminho óptico alongado em conjunto com NSM para aumento da sensibilidade do método desenvolvido por MEKC

		Áreas	
	TPT	CPT	CPT-11
	(2 x 10 ⁻⁺ mol L ⁻⁺)	(1 x 10 ⁻³ mol L ⁻⁺)	(1 x 10 ⁻³ mol L ⁻⁺)
Alinhador normal	22	37	73
Cela de caminho óptico alongado	120 28 x	522 63 x	1113 76 x
Cela de caminho óptico alongado + NSM	620	2323	5538

Tabela 22: Resumo das condições finais otimizadas para o método de determinação e quantificação de CPT e derivados por MEKC, usando também o artifício do empilhamento (NSM) em conjunto com a cela de caminho óptico alongado.

Matriz de baixa condutividade	água:tampão borato 2 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (pH 8,8) 1: 3 v/v	
	Ácido bórico	2 x 10 ⁻² mol L ⁻¹
Tampão de corrida	Surfactante (SDS)	5 x 10 ⁻² mol L ⁻¹
(alta condutividade)	Modificador orgânico (ACN)	7,5% v/v
	рН	8,8
	Temperatura do sistema	25 °C
	Potencial aplicado	25 kV
Parâmetros instrumentais	Tempo de injeção hidrodinâmica	75 s
	Pressão	50 mbar
	Comprimento de onda (λ)	368 nm

Com as condições experimentais definidas, a viabilidade da aplicação do método foi testada através da avaliação dos parâmetros analíticos de mérito, de testes de recuperação em amostras de saliva e da comparação com um método analítico de referência por HPLC.

Da mesma forma como calculada para os valores da Tabela 17, os valores de simetria dos picos, assim como a eficiência e a resolução também foram encontradas para esta condição final otimizada (MEKC usando o artifício do empilhamento (NSM) em conjunto com a cela de caminho óptico alongado). Os valores, todos satisfatórios, encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23: Características do TPT, CPT e CPT-11 quanto ao tempo de migração, eficiência, simetria de pico e resolução por MEKC após condições finais otimizadas para o método, usando também o artifício do empilhamento (NSM) em conjunto com a cela de caminho óptico alongado.

Analitos	Tempo de migração (min)	Eficiência	Simetria	Reso	lução
TPT	4,43 <u>+</u> 0,34	20123	0,85 <u>+</u> 0,05	TPT-CPT	CPT-CPT-11
СРТ	4,77 <u>+</u> 0,45	21187	0,90 <u>+</u> 0,02	3,86 <u>+</u> 0,07	29,72 <u>+</u> 0,61
CPT-11	8,99 <u>+</u> 0,67	31514	1,25 <u>+</u> 0,11		

4.3.3

Parâmetros de mérito do método eletroforético para o CPT e derivados

A validação do método desenvolvido (MEKC) foi feita avaliando-se os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), faixa de resposta linear, precisão e exatidão, de acordo com a European Medicinal Agency CPMP/ICH/381/95 Directive¹²⁷. Estes parâmetros analíticos de mérito foram calculados para o TPT, CPT e CPT-11 nas condições previamente estabelecidas e otimizadas indicadas na Tabela 22.

A fim de mostrar que o método produz uma resposta linear para o CPT e seus derivados em uma faixa útil para análise através do método desenvolvido, um estudo foi realizado usando duas curvas analíticas para cada substância. Os sinais foram medidos em termos de áreas de picos e cada ponto da curva representa o resultado médio de três injeções e a regressão linear foi obtida com ajuda do programa Origin 6.0. Para o TPT, verificou-se resposta linear entre o intervalo testado que se estendeu de 1 x 10⁻⁴ a 1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ com r² = 0,9949. Tanto para o CPT quanto para o CPT-11, a faixa linear obtida ficou entre 1 x 10⁻⁷ e 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com r² = 0,9977 para o CPT e 0,9951 para o CPT-11. A Figura 56 mostra uma curva analítica característica para cada analito e a Figura 57 o comportamento homoscedástico das variâncias obtidas em cada curva. A sobreposição de eletroferogramas obtidos na construção destas curvas pode ser visto na Figura 58.

O valor da precisão instrumental, dada pela repetitividade, foi expressa baseando-se na análise das variáveis (ANOVA) e estimada pelo desvio padrão de seis medições consecutivas do sinal de soluções dos padrões de TPT 1,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, CPT 2,00 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e CPT-11 2,00 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. Os resultados de repetitividade foram de \pm 4,7 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (5,2%) para o TPT; \pm 6,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ (2,4%) para o CPT e \pm 1,1 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (2,6%) para o CPT-11.

A detectabilidade do método em questão foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção (LD) e dos limites de quantificação (LQ). Esses parâmetros foram dados da mesma maneira como já indicado no item 4.2.1.2. Os limites de detecção para o TPT, CPT e CPT-11 foram de 4,3 x 10^{-7} mol L⁻¹; 2,6 x 10^{-8} mol L⁻¹ e 1,3 x 10^{-8} mol L⁻¹, respectivamente. Para os limites de quantificação, os valores obtidos foram de 1,4 x 10^{-6} mol L⁻¹ para o TPT;

8,7 x 10^{-8} mol L⁻¹ para o CPT e 4,3 x 10^{-8} mol L⁻¹ para o CPT-11. Um resumo dos parâmetros de mérito estimados encontra-se na Tabela 24.

A exatidão foi avaliada por meio da comparação de resultados obtidos com o método desenvolvido e um método analítico de referência baseado em HPLC com detecção fluorimétrica³². O detalhamento do método de referência já foi discutido previamente. Os ensaios independentes de amostras de analitos em seis diferentes concentrações realizados por MEKC e por HPLC confirmaram boa exatidão do método proposto, já que a estimativa dos resultados das concentrações de CPT e seus derivados não diferiram significativamente dos valores obtidos com o método de referência. Os valores de t de Student determinados pelo teste-t (1,03) foram inferiores ao valor teórico (2,228), indicando que estatisticamente não houve diferenças significativas entre os dois métodos.



Figura 56: Curvas analíticas para o (a) TPT, (b) CPT e (c) CPT-11 obtidos sob as condições otimizadas (Tabela 22).



Figura 57: Gráficos de resíduo para a determinação de (a) TPT; (b) CPT e (c) CPT-11 por MEKC.



Figura 58: Sobreposição dos eletroferogramas obtidos a partir das Curvas analíticas mostradas na Figura 56.

Tabela 24: Parâmetros Analíticos de Mérito encontrados para o TPT, CPT e CPT-11 em condições otimizadas para a sua determinação por MEKC

	TPT	CPT	CPT-11
λ	368 nm	368 nm	368 nm
Equação da curva	$Y = 6,32 \times 10^6 + 7,24$	$Y = 1,61 \times 10^8 + 64,69$	$Y = 3,77 \times 10^8 - 48,68$
r ²	0,9949	0,9977	0,9951
Precisão ^a	5,2%	2,4%	2,6%
Limite de detecção ^b (3s _b)	4,3 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	2,6 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	1,3 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹
Limite de quantificação ^b (10s _b)	1,4 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	8,7 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	4,3 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹
a Drasisão, estavlado, y	ala nanatiti idada da TD	T 4 40 ⁻⁵ mod 1 ⁻¹ . do 007	F O · · · 4O ⁻⁶ march 1 ⁻¹ a relation

^a Precisão calculada pela repetitividade do TPT 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; do CPT 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e do CPT-11 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹

^b Limite de detecção e limite de quantificação baseados no desvio padrão (S_b) de 10 medições da menor concentração de CPT que se consegue ler na curva analítica. Este S_b é multiplicado por 3 para o LD e por 10 para o LQ.

4.3.4 Testes de recuperação em saliva

A viabilidade do método (MEKC) foi verificada através de testes de recuperação em amostras de saliva obtidas de dois voluntários saudáveis, nãofumantes e que não receberam qualquer tratamento médico prévio a essas experiências. As amostras de saliva foram coletadas em diferentes horários do dia (antes e após almoço). O procedimento para o tratamento das amostras da saliva (fortificadas ou não com quantidades conhecidas dos analitos) foi adaptado de LLABOT *et al*¹²⁸ e foi descrito em detalhes no item 3.2.3.

O eletroferograma da Figura 59 indica a importância do tratamento da saliva antes de seu uso nas análises, com o intuito de se eliminar a influência de componentes da matriz no resultado. Após o procedimento de limpeza (*clean up*), para a minimização do conteúdo protéico das amostras, estas foram injetadas usando as condições otimizadas (Tabela 22). Mesmo com indivíduos diferentes e em horários distintos de coleta da amostra, as linhas de base obtidas, após tratamento, apresentaram-se praticamente sem ruído que pudesse atrapalhar o sinal dos analitos, o que mostra a eficácia do pré-tratamento da saliva.



Figura 59: Eletroferograma de amostra de saliva (a) sem tratamento; (b) póstratamento de *clean up* e obtida de um voluntário na parte da manhã; (c) póstratamento de *clean-up* e obtida de outro voluntário na parte da tarde; (d) póstratamento de *clean up* adicionada previamente de TPT 2 x 10^{-5} mol L⁻¹; CPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹ e CPT-11 1 x 10^{-5} mol L⁻¹.

Os testes de recuperação em amostras de saliva foram feitas com fortificadas de amostras com quantidades conhecidas analito (TPT 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, CPT 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e CPT-11 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹). Somente após a fortificação é que a amostra passou pelo processo de limpeza. Estes testes foram realizados em três dias consecutivos e a média dos percentuais de recuperação (n=3) foram 110 + 7 % para o TPT; 112 + 3 % para o CPT e 108 + 5 % para o CPT-11. Estes resultados foram bastante satisfatórios e confirmaram a eficácia do método proposto. Um resumo dos resultados encontra-se na Tabela 25. A Figura 60 mostra a sobreposição de três eletroferogramas obtidos durante estes testes de recuperação.

	% Recuperação
TPT	110 <u>+</u> 7 %
CPT	112 <u>+</u> 3 %
CPT-11	108+ 5 %

Tabela 25: Médias dos percentuais de recuperação em amostras de saliva fortificadas

com TPT 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, CPT 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e CPT-11 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹



Figura 60: Sobreposição de eletroferogramas de (a) uma solução padrão da mistura de TPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹, CPT 2 x 10^{-6} mol L⁻¹ e CPT-11 2 x 10^{-6} mol L⁻¹; de (b) uma amostra de saliva pós-tratamento e de (c) uma amostra de saliva adicionada de TPT 1 x 10^{-5} mol L⁻¹, CPT 2 x 10^{-6} mol L⁻¹ e CPT-11 2 x 10^{-6} mol L⁻¹ e após tratamento para desproteinização.