

7 Conclusões

7.1

Determinações fluorimétricas e eletroforéticas para a camptotecina e derivados

Com o objetivo de permitir uma detecção simples, rápida e barata de contaminações de camptotecina (CPT) em formulações farmacêuticas cujo princípio ativo é a irinotecana (CPT-11) ou a topotecana (TPT), foram desenvolvidos dois métodos espectrofluorimétricos (alternativos aos métodos baseados em HPLC), sendo um deles baseado na derivação fotoquímica com radiação UV. Inicialmente foram feitos estudos das características fluorescentes destes três alcalóides, o qual indicou que ao se ajustar a concentração de NaOH para $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e se usar 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. Testes de interferência foram feitos para misturas CPT/TPT, utilizando varreduras sincronizadas com $\Delta\lambda = 82 \text{ nm}$ (diferença entre os valores λ_{exc} (368 nm) e λ_{em} (450 nm) do CPT), e para misturas CPT/CPT-11, utilizando 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. Demonstrando a viabilidade de utilizar estas condições para desenvolver o método analítico espectrofluorimétrico, 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. 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). 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. 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 $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Já nas condições otimizadas para a determinação de CPT na presença de TPT, observa-se uma faixa linear ($r^2 = 0,9991$) que foi até a concentração de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CPT. A precisão das medições foi avaliada pelo ensaio de repetitividade. Os resultados, que variaram entre 3,17% e 3,88%. LD e de LQ para o CPT nas duas condições experimentais foram bastante similares (na mesma ordem de grandeza, $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). A incerteza de quatro fontes relevantes para a medição de fluorescência do CPT sob as condições seletivas estabelecidas no presente trabalho foram estudadas: repetitividade, reprodutibilidade, curva analítica e preparação de soluções. A incerteza expandida (U) associada à medida de fluorescência de um padrão de CPT $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foi de $6,94 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (com $\lambda_{\text{iso}} = 267 \text{ nm}$ e espectro de segunda derivada) e de $1,23 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (com $\lambda = 368 \text{ nm}$, usando espectro de varredura sincronizada). Esses valores equivalem respectivamente a 24 e 13% da concentração nominal do CPT ($5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). A viabilidade da aplicação dos métodos foi testada através de testes de recuperação em formulações farmacêuticas de CPT-11 (Camptosar) e de TPT (Hycamtin) fortificados com CPT para simular contaminação das formulações. Um método analítico, baseado no uso do HPLC com detecção de fluorescência foi usado como referência para a validação. Para amostras de Camptosar, contendo $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do CPT-11 e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CPT, a média de recuperação do CPT foi de $95\% \pm 12\%$ ($n = 3$) utilizando o método proposto para as determinações de CPT na presença de CPT-11 e $104\% \pm 7\%$ ($n = 3$), utilizando o método de referência (HPLC). Para amostras de Hycamtin, contendo $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de TPT e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CPT, a recuperação média da CPT foi de $91 \pm 6\%$ ($n=3$) usando o método espectrofluorimétrico proposto para as determinações de CPT na presença de TPT e $100 \pm 3\%$ ($n=3$) usando HPLC. Testes de hipóteses mostraram que não há diferença significativa entre os resultados dos diferentes métodos, indicando a sua boa adequação para a aplicação proposta (contaminação de medicamentos). Vale ressaltar que a única limitação deste método é quando a condição de proporção CPT:derivado não é a ideal, pois neste caso nem a adição padrão nas amostras adiantaria por causa da interferência espectral proveniente das características fluorescentes de cada analito e não da matriz em si.

Ainda com foco na contaminação de medicamentos, na segunda parte deste trabalho foi feito um estudo das características fluorescentes da

camptotecina e de seus derivados após tratamento fotoquímico (outra maneira de também eliminar as interferências espectrais que impossibilitam a determinação seletiva do CPT). Estes estudos indicaram que ocorrem mudanças na estrutura da camptotecina (em meio de NaOH 1,0 mol L⁻¹) causadas pela incidência da irradiação UV em suas soluções, uma vez que a intensidade de fluorescência deste analito teve um aumento de quase dez vezes depois de apenas cerca de 26 min de exposição à irradiação UV quando comparado ao observado em solução de NaOH 1 mol L⁻¹ não irradiada, indicando a formação de um derivado fluorescente com maior eficiência quântica do que a fluorescência da sua molécula original. Estudos posteriores mostraram que esse sinal fluorescente do CPT foi máximo no intervalo de exposição ao UV entre 20 e 40 min. 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. Em contrapartida, a fluorescência do CPT-11 (450/550 nm), que era observada em meio fortemente alcalino (NaOH 1,0 mol L⁻¹), foi praticamente eliminada após 30 min de exposição ao UV. 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. Enfim, a exposição à irradiação 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. 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. 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. Esses valores foram 26 min para o tempo de exposição UV e 1,02 mol L⁻¹ para a concentração de NaOH. Interessante ressaltar que esses valores ótimos indicados no planejamento experimental foram muito próximos aos encontrados no estudo univariado. A fim de verificar a viabilidade da aplicação do método analítico em misturas contendo CPT-11 e TPT também foram realizados testes de interferência com misturas sintéticas, os quais mostraram que não foram encontradas interferências na fluorescência do CPT em misturas contendo até 50 vezes mais TPT (CPT:TPT, 1:50). 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 espectros de excitação do CPT em NaOH 1 mol L⁻¹ (sem irradiação UV das soluções dos analitos). 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. 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. 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. Os resultados de LD e LQ 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. As mesmas fontes relevantes de incerteza relativas à medição da fluorescência do CPT e derivados sem o uso da irradiação UV, foram identificadas também para o método que utiliza a irradiação UV das soluções dos analitos. A incerteza relativa ao preparo das soluções teve grande impacto na incerteza expandida (4,39 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ para o caso soluções preparadas volumetricamente e 5,70 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ para soluções preparadas por ajuste gravimétrico de padrão e solvente). A avaliação do 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. 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. Testes experimentais utilizando as técnicas Cf-PDMS e LDI (*laser desorption ionization*) foram feitos com o objetivo de tentar identificar os fotoprodutos que são produzidos após 26 min de irradiação UV da solução de camptotecina em hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹. Apesar de nenhum resultado satisfatório ter sido encontrado até o momento, trabalhos futuros continuarão sendo feitos para esta identificação por meio da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

Tendo explorado as aplicações das características fluorescentes deste grupo de analitos para os métodos espectrofluorimétricos desenvolvidos, prosseguiu-se com estudos de separação e quantificação do CPT e derivados utilizando a cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) com detecção por fotometria de absorção. Para a otimização deste método, 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. Para finalizar a otimização com base nos estudos univariados, um planejamento fatorial (CCD), usando três parâmetros mais críticos, foi empregado para conseguir o ajuste final das melhores condições para o método. Uma das formas de se melhorar a sensibilidade da detecção foi por meio de processos de pré-concentração no capilar usando a técnica denominada “empilhamento” (neste trabalho foi usado o *Normal Stacking Mode* – NSM). Com isso, as áreas do TPT, CPT e CPT-11 tiveram um aumento de 28, 63 e 76 vezes, consecutivamente, quando comparadas ao método no qual é usado somente o alinhador convencional (normal). Nestes estudos de otimização, as condições finais obtidas foram: (i) matriz de baixa condutividade composta por água ultrapurificada:tampão borato $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,8) 1:3 v/v; (ii) tampão de corrida (alta condutividade) composto por ácido bórico $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,8), surfactante (SDS) $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 7,5 % v/v de modificador orgânico (acetonitrila); (iii) parâmetros instrumentais ajustados em 25 °C para a temperatura, 25 kV para a voltagem aplicada, 75 s de tempo de injeção hidrodinâmica, 50 mbar de pressão e comprimento de onda igual a 368 nm. Nas condições otimizadas, para o TPT verificou-se resposta linear entre o intervalo testado que se estendeu de 1×10^{-4} a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $r^2 = 0,9949$. Tanto para o CPT quanto para o CPT-11, a faixa linear obtida ficou entre 1×10^{-7} e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com $r^2 = 0,9977$ para o CPT e 0,9951 para o CPT-11. 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 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, CPT $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e CPT-11 $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados de repetitividade foram de $\pm 4,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (5,2%) para o TPT; $\pm 6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (2,4%) para o CPT e $\pm 1,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (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). Os limites de detecção para o TPT, CPT e CPT-11 foram de $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $2,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Para

os limites de quantificação os valores obtidos foram de $1,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o TPT; $8,7 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o CPT e $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o CPT-11. 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 fluorimétrica. 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. A viabilidade do método (MEKC) foi verificada através de testes de recuperação em amostras de saliva obtidas de dois voluntários saudáveis, não-fumantes e que não receberam qualquer tratamento médico prévio a essas experiências. Estas amostras de saliva passaram por um processo de *clean up* com a finalidade de obtenção de uma linha de base favorável à determinação do TPT, CPT e CPT-11. Quantidades conhecidas de cada analito foram adicionadas às amostras e, após três dias consecutivos de testes de recuperação, a média (n=3) obtida foi de $110 \pm 7 \%$ para o TPT; $112 \pm 3 \%$ para o CPT e $108 \pm 5 \%$ para o CPT-11. Estes resultados foram satisfatórios e também confirmaram a utilidade e eficácia do método proposto.

7.2

Determinação de beta-carbolinas por SS RTP

Na sequência do trabalho, com o objetivo de expandir a pesquisa iniciada no Mestrado, dois estudos de caso ((i) a determinação seletiva de harmol na presença de outras quatro β -carbolinas e (ii) determinação de harmane na presença de harmine em chás.) foram feitos para a avaliação da seletividade da detecção de uma β -carbolina na presença de outras usando métodos analíticos baseados na fosforimetria na temperatura ambiente e substrato sólido (SS RTP), evitando a separação prévia de componentes. Inicialmente, foi feito um estudo das características fosforescentes das substâncias em diferentes condições experimentais, seguido da maximização do sinal fosforescente de cada uma das substâncias nas condições experimentais mais propícias para observação do sinal fosforescente. Para tal, o papel de filtro, previamente tratado para redução do sinal de fundo, foi utilizado como substrato sólido para imobilização dos analitos. A aplicação de técnica de varredura sincronizada e de 2ª derivação e o

uso do efeito externo seletivo do átomo pesado aumentaram o grau de seletividade e de discriminação entre amostras, pois induziu fosforescência de componentes específicos na amostra e melhoraram a resolução espectral dos resultados. Estudos de interferência utilizando a condição seletiva adotada (soluções dos analitos em pH original e 0,81 mg de HgCl_2 depositados no papel) e varreduras em 2ª derivada do espectro de emissão com comprimento de onda isodiferencial de 564 nm, mostraram que não houve interferência significativa do harmine, harmane, norharmane e harmaline (considerados interferentes) em quantidades até 10 vezes maiores que o analito de interesse (no caso, o harmol). A avaliação do método SS RTP seletivo proposto para determinação de harmol foi comparado com o resultado obtido por um método de referência adaptado baseado na cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), o qual mostrou sua capacidade para a determinação seletiva de harmol na presença de harmane, harmine, norharmane e harmaline. Nos parâmetros de mérito obtidos, verificou-se uma faixa linear ($r^2 = 0,9937$ para as determinações por SS RTP e $r^2 = 0,9999$ para as determinações por MEKC) que se estendeu até a concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para ambos os métodos. O limite de detecção obtido foi da ordem do ng, mostrando a capacidade para detecção sensível em termos de massa efetiva de analito. Testes de recuperação em amostras de urina fortificadas indicaram resultados bastante satisfatórios. Também foi desenvolvido um método analítico baseado na SS RTP para a determinação de harmane na presença de harmine em chás. Estudos de otimização mostraram como condição ideal aquela que utiliza AgNO_3 como sal de átomo pesado depositado no papel previamente à adição das soluções dos analitos em pH 11 (tampão Britton-Robinson) e leituras feitas em comprimento de onda isodiferencial igual a 322 nm no espectro de 2ª derivada da varredura sincronizada ($\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$). Testes de interferência mostraram que o próprio chá não tem influência no sinal do harmane e que a mistura contendo harmane:tampão:solvente:chá 1:1:4:4 foi escolhida como a melhor para ser usada. Nas condições otimizadas para a determinação de harmane na presença de harmine em concentrações até 2 vezes maiores, verifica-se uma faixa linear ($r^2 = 0,9874$) que se estendeu até a concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O teste de repetitividade mostrou o valor de 9,0 %, o que é satisfatório para a técnica realizada em substrato sólido. Os limites de detecção e quantificação absolutos encontrados para o harmane foram de 3,1 e 10,3 ng, respectivamente. Em amostras de chá de camomila, erva-doce e capim-cidreira, a média de recuperação do harmane na presença, em quantidades duas vezes maiores de

harmine, ficou em torno de 100%, comprovando a eficácia do método desenvolvido.

7.3 Estudos de incerteza

A incerteza associada à medição de fluorescência foi estimada e as fontes principais de incertezas identificadas e quantificadas, sendo as mais relevantes avaliadas: “Repetitividade” (u_r), “Reprodutibilidade” (u_R), “Curva analítica” (u_{curva}) e “Preparo de solução padrão de analito” (u_s). Posteriormente foram calculadas as incertezas combinada (u_c) e expandida (U). Para as soluções de analito preparadas por volume, a incerteza expandida ($k=2,95\%$) foi de $1,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sendo as contribuições individuais das fontes de $3,30 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (repetitividade), $4,92 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (reprodutibilidade), $1,38 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (solução de analito preparada por volume) e $8,76 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (curva analítica).

A fonte mais relevante do processo foi a “solução padrão de analito” preparada por ajuste de volume ($7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). A contribuição dessa fonte foi minimizada pela preparação de solução por meio de ajuste de massa, causando um grande impacto na redução da incerteza expandida, que foi estimada em $2,12 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Para esse estudo, um hidrocarboneto policíclico aromático, o criseno, foi utilizado. Vale ressaltar que a literatura não reporta a avaliação de incerteza associada ao uso de método baseado na fluorimetria.

A incerteza associada à medição de fosforescência pela técnica SS RTP também foi estudada e estimada na determinação de um fósforo, o criseno (hidrocarboneto policíclico aromático (HPA)). A incerteza expandida ($k=2,95\%$) encontrada foi de $3,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sendo indicadas as mesmas contribuições de fontes relevantes avaliadas na fluorimetria: repetitividade ($1,33 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$); reprodutibilidade ($1,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); curva analítica ($5,44 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e preparo de solução crítica ($7,69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). A quantificação das contribuições indicou que todas as quatro fontes são relevantes no cálculo das incertezas combinada e expandida, em especial a reprodutibilidade, devido, provavelmente, a variações nos sinais produzidos pela pouca homogeneidade nos substratos sólidos utilizados nas medições.