

## **3 Resultado e discussão**

### **3.1 Otimização das condições experimentais**

A seletividade e a sensibilidade da resposta analítica em um método voltamétrico dependem das condições experimentais e instrumentais escolhidas. Sendo assim, uma etapa de otimização se faz necessária, onde o pré-requisito inicial é a obtenção da corrente faradaica da espécie química de interesse. A composição do eletrólito suporte e os parâmetros relacionados com a aplicação da voltagem no eletrodo de trabalho são fundamentais para a obtenção de um bom desempenho analítico.

#### **3.1.1. Estudo do eletrólito suporte e do pH**

Um primeiro estudo para a escolha de eletrólito suporte foi realizado com a solução tampão Britton-Robinson (BR), pois este tampão possibilitava a avaliação da faixa de pH entre 2,0 e 12,0. Desse modo, poderia-se observar em qual faixa de pH se obteria o sinal analítico da sibutramina. Nesse estudo, alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  de soluções-padrão de sibutramina de 300  $\text{mg L}^{-1}$  (4,4  $\text{mg L}^{-1}$  de concentração final) foram usadas. O formato do pico do analito (que pode influenciar na resolução das medições), a sua intensidade, o nível de ruído e potencial de pico foram avaliados a partir dos voltamogramas obtidos em cada valor pH estudado.

Para as soluções com pH acima de 6,0 não se observou resposta analítica. Na faixa ácida de pH (valores de pH entre 2,0 e 6,0), observou-se corrente proveniente da redução da sibutramina, resultados mostrados na Tabela 1, onde o potencial de pico aumentou levemente na medida em que o pH do tampão foi variado de 2,0 para 6,0. Nesse caso, a magnitude da corrente variou muito pouco entre os valores de pH 3,0 e 6,0. Em contrapartida, pulsos com menor largura e menor sinal de branco foram obtidos em eletrólito suporte com pH 4,0. Assim sendo, o valor de pH 4,0 foi escolhido para a sequência de trabalho com a sibutramina. Adicionalmente, o deslocamento do potencial

de pico foi constante entre o pH 3,0 e pH 5,0 o que significa que a escolha do pH 4,0 produziu uma condição robusta com relação ao potencial de pico.

Tabela 1 - Características da resposta analítica da sibutramina ( $4,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) em tampão BR.

pH*	Potencial de pico ( $E_p$ )	Corrente faradaica ( $i_L$ )	Largura do pico na metade da altura ( $b_{1/2}$ )
2	-139 mV	17,5 nA	116 mV
3	-109 mV	23,2 nA	111 mV
4	-108 mV	24,3 nA	100 mV
5	-108 mV	24,8 nA	106 mV
6	-92 mV	25,0 nA	111 mV

\*para pH de 6-12 – não se observou resposta analítica

Escolhido o pH do eletrólito suporte, fez-se uma avaliação da resposta analítica da sibutramina em outros sistemas tamponados (tampão Mcllvaine pH 4,0; tampão acetato pH 4,0; tampão ftalato ácido de potássio pH 4,0). Dos quatro tampões testados, o resultado com o tampão Mcllvaine pH 4,0 apresentou um perfil de pulso mais fino, uma maior corrente limite como pode ser constatado na Figura 7 e menor sinal de fundo (Figura 8).

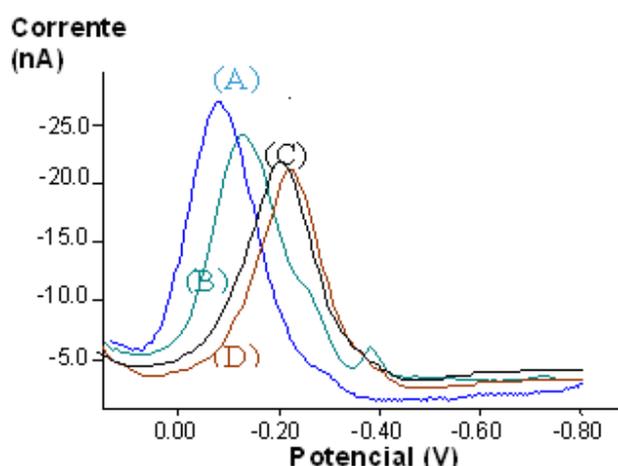


Figura 7 - Voltamogramas obtidos para padrão de sibutramina  $20,9 \text{ mg L}^{-1}$  usando como eletrólito suporte: (A) tampão Mcllvaine pH 4,0, (B) tampão BR pH 4,0, (C) tampão ftalato ácido de potássio e (D) tampão acetato pH 4,0

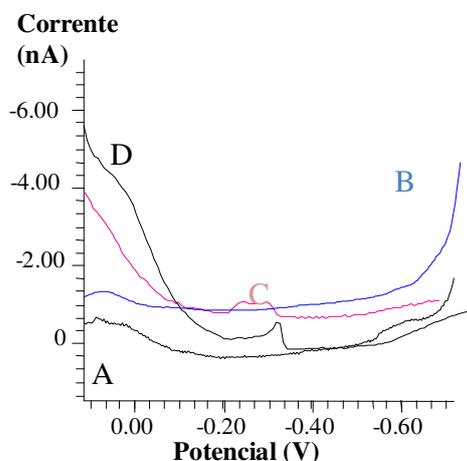


Figura 8 - Valores dos brancos obtidos usando como eletrólito suporte: (A) tampão Mcllvaine pH 4,0, (B) tampão BR pH 4,0, (C) tampão ftalato ácido de potássio e (D) tampão acetato pH 4,0

### 3.1.2. Estudo da pré-concentração de sibutramina na gota de mercúrio

Uma das vantagens da voltametria é a possibilidade de se pré-concentrar o analito no eletrodo de trabalho. No caso de espécies orgânicas, a pré-concentração é, na maioria das vezes, um processo adsorptivo, requerendo condições especiais para tal. Estudos visando pré-concentrar a sibutramina no eletrodo de mercúrio foram realizados em tampão Mcllvaine com valores de pH entre 2,0 e 5,0 e também em soluções de ácido clorídrico ou sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Variações no tempo de pré-concentração de 20 a 100 s foram testadas, no entanto, verificou-se que a sibutramina não pré-concentrou na gota de mercúrio.

### 3.1.3. Otimização da velocidade de varredura para DPV

A velocidade de varredura pode influenciar tanto a magnitude do sinal analítico quanto o formato do pico. Em geral, velocidades de varredura mais lentas são usadas no modo de pulso diferencial. Foram estudadas velocidades de varreduras entre 10 a 50 mV s<sup>-1</sup> (Tabela 2) usando tampão Mcllvaine pH 4,0 e padrão sibutramina em concentração final na cela eletrolítica igual a 20,9 mg L<sup>-1</sup>. Resultados como menor largura de pico, nível de ruído e magnitude da corrente faradaica foram levados em consideração na escolha da velocidade de varredura. Os resultados apontaram que, para voltametria de pulso

diferencial, os valores de corrente e de largura de pico foram praticamente constantes no intervalo de valores testados. No entanto um formato de pico ligeiramente mais definido (menor  $b_{1/2}$ ) foi obtido com velocidade de varredura igual  $40 \text{ mV s}^{-1}$ , sendo este valor o escolhido para o método de voltametria de pulso diferencial.

Tabela 2 - Resultados obtidos para  $E_p$ ,  $i_L$ , e  $b_{1/2}$  para diferente velocidades de varredura usando padrão de sibutramina  $20,9 \text{ mg L}^{-1}$

Velocidade de Varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )	Potencial de pico $E_p$	Corrente faradaica $i_L$	Largura do pico na metade da altura $b_{1/2}$
10	-84 mV	48,6 nA	160 mV
20	-76 mV	46,2 nA	168 mV
30	-74 mV	44,8 nA	160 mV
40	-76 mV	44,5 nA	152 mV
50	-68 mV	44,2 nA	168 mV

#### 3.1.4. Estudo da amplitude

A amplitude tem influência no formato de pico voltamétrico e também pode afetar a linearidade da resposta analítica. No presente estudo, a amplitude de pulso foi variada de 10 a 100 mV em células contendo sibutramina  $20,9 \text{ mg L}^{-1}$  em tampão McIlvaine pH 4,0.

Na Figura 9 observa-se que embora a magnitude da corrente faradaica aumente com o aumento da amplitude de pulso, um deslocamento anódico do potencial de pico é obtido, assim como um aumento significativo da largura do pulso, o que pode degradar a resolução e acabar interferindo nas análises da sibutramina em matrizes complexas. Desse modo, a amplitude de 50 mV foi escolhida para as análises.

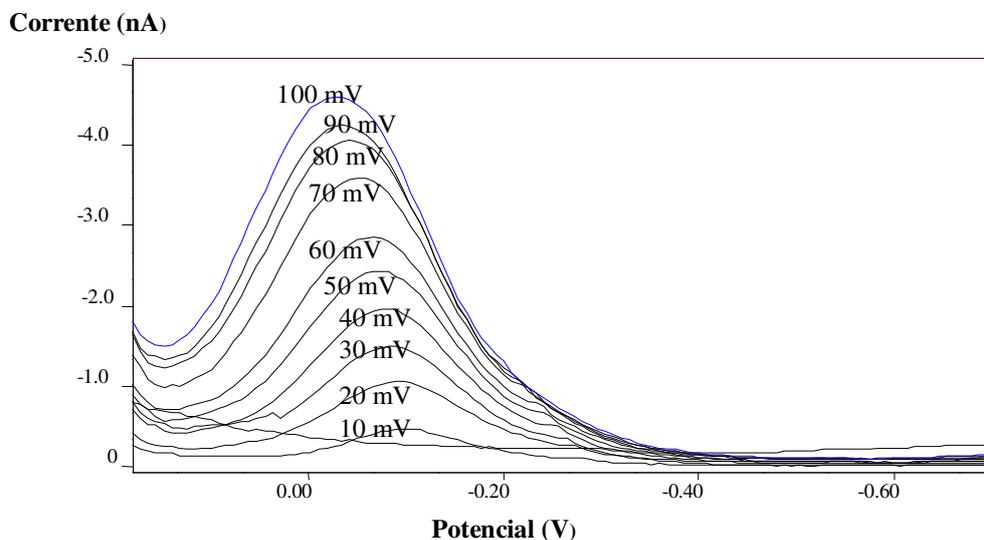


Figura 9 - Voltamogramas obtidos para valores crescentes de amplitude (10 a 100 mV) de baixo para cima do gráfico. Condições experimentais: DPV, padrão de sibutramina 20,9 mg L<sup>-1</sup>, tampão McIlvaine pH 4,0 e velocidade de varredura 40 mV s<sup>-1</sup>

### 3.1.5. Estudo da frequência na aplicação do modo SWV

Na técnica voltamétrica de onda quadrada, a velocidade de varredura (mV s<sup>-1</sup>) é um produto de dois parâmetros: o incremento de potencial (em mV) e a frequência do pulso (em s<sup>-1</sup>). Assim sendo, diversos valores de amplitude e de frequência foram testados usando concentração final de sibutramina igual a 20,9 mg L<sup>-1</sup> em tampão McIlvaine pH 4,0. Os valores de frequência aplicados foram variados entre 10 a 100 Hz. A partir desses estudos, verificou-se que o incremento de potencial de 8 mV era adequado e que a escolha da frequência teve grande influência no ruído e no formato do pulso. Os voltamogramas da Figura 10 exemplificam essa influência e indicam que a frequência de 30 Hz foi a mais adequada para aplicação em conjunto com incremento de potencial de 6 mV. Na Figura 11, a influência do incremento de potencial nos voltamogramas, obtidos com a aplicação de frequência de 30 Hz, são mostrados, justificando a escolha do valor de incremento de potencial de 8 mV. Logo, a velocidade de varredura para a técnica de onda quadrada foi igual a 240 mV s<sup>-1</sup>.

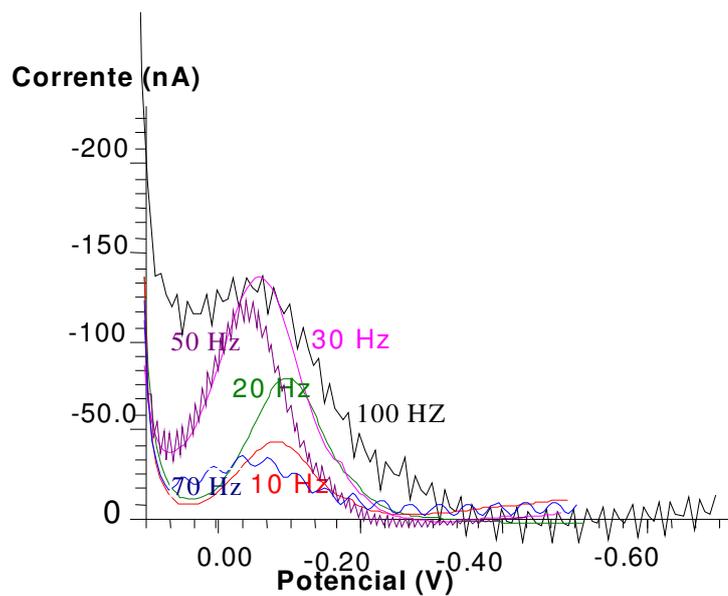


Figura 10 - Voltamogramas obtidos da sibutramina usando frequência de 10; 20; 30; 50 e 100 Hz com incremento de potencial de 8 mV

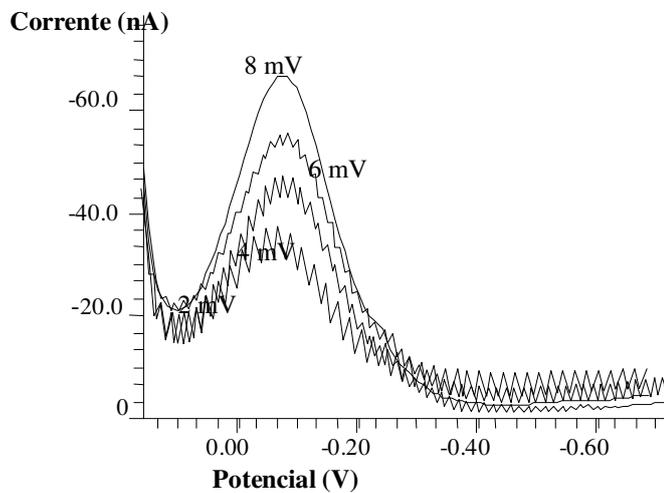


Figura 11 - Influência do incremento de potencial nos voltamogramas. Variações de 2; 4; 6 e 8 mV

## **3.2. Validação das metodologias eletroanalíticas desenvolvidas por DPV e SWV**

Após o desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas foi feita a validação de acordo com o documento de Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (INMETRO, 2007) usando o padrão de sibutramina da Abbott (lote 543699W). Validação significa comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (NBR ISO 9000). Portanto, para que os resultados de análise sejam confiáveis é necessário que estas sejam executadas através de um método analítico validado. No processo de validação foram avaliadas as faixas de resposta analítica linear, sensibilidade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade, precisão intermediária e especificidade/seletividade.

### **3.2.1. Validação para a técnica DPV**

#### **3.2.1.1 Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção (LD) é definido como a quantidade mínima do analito que pode ser detectada com confiabilidade (95 ou 99%), mas não necessariamente quantificada como um valor exato (INMETRO, 2007). Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e certeza (*trueness*) (INMETRO, 2007).

O limite de detecção foi determinado a partir de adições de pequenos volumes de solução padrão de sibutramina à célula eletrolítica contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0, até a detecção de sibutramina. A quantidade mínima de sibutramina detectada foi de 0,4 mg L<sup>-1</sup>.

O limite de quantificação foi obtido pela adição de solução padrão de sibutramina à célula eletrolítica contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0, até que a menor quantidade adicionada de sibutramina pudesse ser quantificada. A menor concentração de sibutramina quantificada foi 1,4 mg L<sup>-1</sup>. Este valor foi então certificado pela análise de 10 amostras independentes contendo sibutramina na concentração encontrada. A partir dos resultados obtidos, mostrados no Anexo 1, verificou-se o valor médio encontrado foi igual a 1,4 mg L<sup>-1</sup> com desvio padrão (s) 0,16 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2.1.2

#### **Faixa de resposta linear e sensibilidade da resposta analítica da sibutramina por voltametria de pulso diferencial**

A linearidade corresponde à capacidade de um método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (INMETRO, 2007). A linearidade pode ser estimada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) e pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtidos através da regressão linear, onde também é possível calcular os coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ . Os coeficientes de correlação e de determinação permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A equação da reta que relaciona a concentração com a corrente medida é representada pela equação (5):

$$y = bx + a \quad (5)$$

Onde:  $y$  é resposta medida (Corrente),  $x$  é a concentração, “ $b$ ” é a inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e “ $a$ ” é a interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

A faixa de resposta analítica linear foi testada no intervalo de concentração de sibutramina entre 1,4 mg L<sup>-1</sup> (LQ) até 33,3 mg L<sup>-1</sup>. O teste de Jack-Knife (Souza & Junqueira, 2005) foi usado nessa avaliação por ser um teste completo onde se obtém informações importantes como coeficiente de correlação, teste de homo/heterocedasticidade, valores de dispersão e gráfico de resíduos. Uma planilha, desenvolvida pelo Departamento de Química do INCQS/FIOCRUZ, foi usada como ferramenta de apoio nessa avaliação. A Planilha 1 representa o resumo das características para a curva analítica da sibutramina.

A linearidade da curva analítica de sibutramina na faixa de concentração estudada foi confirmada pelo teste de Jack-Knife. Nenhum valor extremo foi encontrado. A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner (Souza & Junqueira, 2005). A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homocedasticidade, a estatística  $t$  de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciado pelo teste de Durbin-Watson (Souza & Junqueira, 2005). Os resultados

permitem concluir que a significância da regressão foi alta ( $p < 0,001$ ) com desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ). O método está livre de tendência (valor p da interseção  $> 0,05$ ).



Na Tabela 3 são apresentadas as condições experimentais escolhidas para a melhor resposta analítica usando a técnica voltamétrica de pulso diferencial.

Como a faixa de trabalho escolhida nas determinações de sibutramina ficou entre 7,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>, uma nova avaliação de linearidade para a curva neste intervalo de concentrações específico foi realizada. Curvas analíticas na faixa de trabalho para a determinação de sibutramina foram construídas, adicionando à célula eletrolítica (contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0) cinco alíquotas consecutivas de 250 µL do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações finais de sibutramina foram 7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>. Para cada concentração de sibutramina foram feitas quatro réplicas de leitura da corrente. Os valores médios de corrente obtidos (em nA) foram graficados em função da concentração de sibutramina na cela eletrolítica. Na Figura 12 e na Figura 13 são mostrados os voltamogramas e a curva analítica (concentração em mg L<sup>-1</sup> versus corrente em nA) obtidos.

Tabela 3 - Condições operacionais utilizadas para o preparo da curva analítica de sibutramina por voltametria de pulso diferencial

Eletrodo de trabalho	HMDE
Eletrólito suporte	Tampão McIlvaine pH 4,0
Potencial de pico	-80 mV
Amplitude	50 mV
Área da gota de mercúrio	0,3187 mm <sup>2</sup>
Concentração do padrão	300 mg L <sup>-1</sup>
Volume da solução padrão	250 µL (cinco adições)
Volume do eletrólito	10,0 mL
Potencial inicial	170 mV
Potencial final	-800 mV
Velocidade de varredura	40 mV s <sup>-1</sup>
Tempo de purga	300 s
Tempo de pulso	40 ms

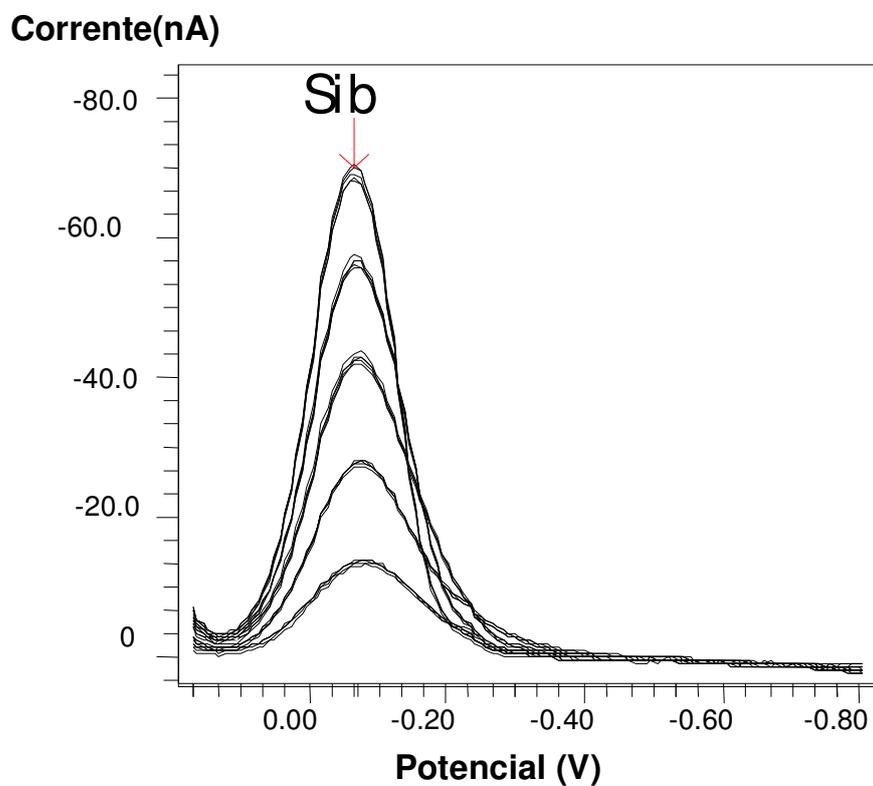


Figura 12 - Exemplo de voltamogramas utilizados no preparo da curva analítica (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>) da sibutramina por voltametria de pulso diferencial nas condições descritas na Tabela 3

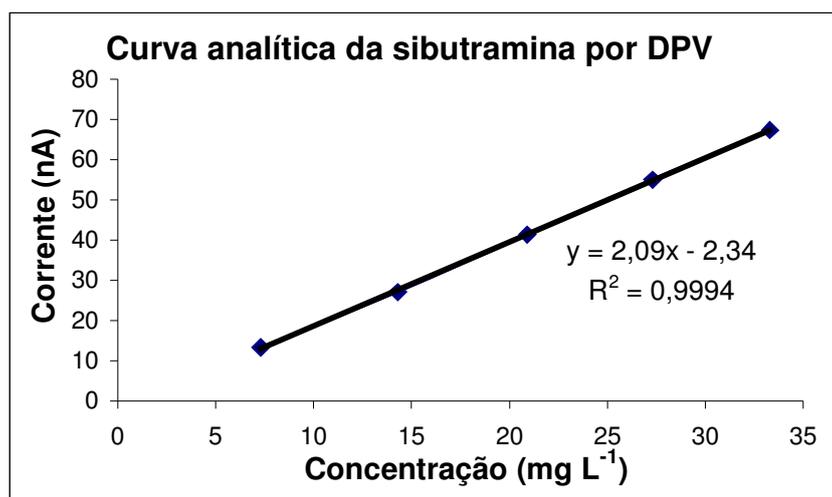


Figura 13 - Curva analítica da sibutramina (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>) por voltametria de pulso diferencial realizada de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 3

Uma avaliação estatística completa foi realizada e os resultados resumidos na Planilha 2. A curva analítica obtida foi:  $y = 2,09x - 2,34$  e o valor de  $R^2$  encontrado foi 0,9994. Os outros parâmetros também indicaram linearidade da resposta e homocedasticidade dos resultados.

Planilha 2 - Teste de Jack-knife para a curva analítica da sibutramina (7,3 a 33,3 mg L<sup>-1</sup>) por pulso diferencial

Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		INCCQS			
<b>AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Determinação de Sibutramina por voltametria				
Data de Confeção da Curva:	25/4/2008	Curva N°:			
Replicatas por Nível (k):	4	N° de Níveis (n):	5		
Equipamento:	Responsável:				
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. mg/l	Resposta corrente		
1	01	7,32E+00	1,33E+01		
	02	7,32E+00	1,33E+01		
	03	7,32E+00	1,35E+01		
	04	7,32E+00	1,34E+01		
2	05	1,43E+01	2,68E+01		
	06	1,43E+01	2,71E+01		
	07	1,43E+01	2,74E+01		
	08	1,43E+01	2,71E+01		
3	09	2,09E+01	4,15E+01		
	10	2,09E+01	4,20E+01		
	11	2,09E+01	4,09E+01		
	12	2,09E+01	4,10E+01		
4	13	2,73E+01	5,52E+01		
	14	2,73E+01	5,43E+01		
	15	2,73E+01	5,44E+01		
	16	2,73E+01	5,51E+01		
5	17	3,33E+01	6,74E+01		
	18	3,33E+01	6,82E+01		
	19	3,33E+01	6,68E+01		
	20	3,33E+01	6,81E+01		
<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
<b>Curva Analítica Final</b>					
<b>Gráfico de Resíduos</b>					
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,97				
Rcrit (α = 0,05)	0,95				
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	2,23				
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,20				
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,41				
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	2,54E-01				
t <sub>c</sub> calculado	-3,37E-01				
t <sub>tabelado</sub> (α = 0,05)	2,10E+00				
p	7,40E-01				
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade	p > 0,05				
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa	p < 0,001				
Não há desvio de Linearidade	p > 0,05				
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Não há autocorrelação	d > dU				
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal	Req > Rcrit				
<b>Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)</b>					
<i>Estadísticas da Regressão</i>					
Coefficiente Angular (b):	2,09E+00	Coefficiente Linear (a):	-2,34E+00		
r	0,9997	R <sup>2</sup>	0,9994		
N	20	Graus de Liberdade	18		
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	7,41E+03	7,41E+03	2,86E+04	2,82E-30
resíduos	18	4,66E+00	2,59E-01		
Ajuste	4	1,58E+00	3,94E-01	1,79E+00	1,87E-01
erro puro	14	3,08E+00	2,20E-01		
total	19	7,41E+03			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA				Pág.:1/1	

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e depende da natureza do analito e da técnica utilizada. A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração na faixa de trabalho escolhida para a determinação de sibitramina, conforme a equação (6), indicando um valor igual a 2,09 nA L mg<sup>-1</sup>.

$$S = dc / dx \quad (6)$$

Onde:  $S$  é sensibilidade;  $dx$  é variação da resposta;  $dc$  é variação da concentração.

### **3.2.1.3. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é representada pelo grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007).

Para se verificar a exatidão do método proposto para a sibutramina, preparou-se uma solução 7,5 mg L<sup>-1</sup> a partir de uma amostra de medicamento contendo sibutramina (Biomag<sup>®</sup>) e comparou-se a média de sete medições desta solução interpolando o mesmo na curva analítica ( $y \text{ (nA)} = 1,798x \text{ (mg L}^{-1}) - 2,188$ ) e comparando o resultado com o valor verdadeiro (7,5 mg L<sup>-1</sup>). A porcentagem de recuperação do método de análise, ou seja, sua exatidão foi de 90,4%.

### **3.2.1.4. Seletividade/Especificidade**

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos e da matriz que pode ter algum efeito na medição, mas cujos componentes não se quer quantificar.

Segundo Vessman J. (1996) especificidade e seletividade são dois graus de um mesmo parâmetro, um método altamente seletivo pode ser praticamente específico para o analito em questão. Essa é uma situação rara e não condiz com a técnica de voltametria, cujos parâmetros experimentais podem ser ajustados para que o método seja seletivo em relação a um analito de interesse em uma matriz específica.

Para a avaliação de seletividade, o número de amostras independentes em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a sete para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida. Primeiro, faz-se o teste F para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, calculando-se pela equação (7):

$$F = s_1^2 / s_2^2 \quad (7)$$

Onde  $s_1^2$  e  $s_2^2$  são as variâncias de cada amostra, com a maior variância no numerador.

Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de  $F$  *tabelado*, com  $(n_1-1)$  graus de liberdade no numerador e  $(n_2-1)$  graus de liberdade no denominador; nesse trabalho adotou-se um nível de confiança de 95%. Quando o teste F não é significativo, isto é, se  $F$  *calculado* for menor que o  $F$  *tabelado*, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição  $t$  de Student. Neste caso, calculam-se  $X_{1\text{media}}$  e  $X_{2\text{media}}$  que são os valores médios das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz” na mesma faixa de concentração. Os valores  $s_1$  e  $s_2$  são os desvios-padrão das respostas dos analitos dos dois grupos de amostras. Já  $t$ , é dado pela Equação 8:

$$t = (X_{1\text{media}} - X_{2\text{media}}) / [s^2 (1/n_1 + 1/n_2)]^{1/2} \quad (8)$$

O valor de  $t$  *tabelado* é obtido a partir da tabela da distribuição de Student (Anexo 3) para  $(n_1 + n_2 - 2)$  graus de liberdade e a confiança desejada.

Quando a matriz sem o analito não for disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão de analito na amostra com a curva analítica do analito. Isto é feito preparando-se dois grupos de amostras que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz de amostra. Os resultados destas amostras podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analito adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pela quantidade inicial do analito.

No caso da sibutramina não foi possível obter a matriz pura do medicamento. Então, optou-se por fazer uma análise do medicamento Sandoz<sup>®</sup> 15 mg lote 41748R por adição padrão e por medição direta da corrente correspondente da amostra contendo sibutramina na curva analítica apresentada na Figura 12 para verificar se a matriz tem efeito direto nas análises. A concentração do padrão preparada foi de 300 mg L<sup>-1</sup> e a concentração do analito na amostra (Sandoz<sup>®</sup>) foi 300 mg L<sup>-1</sup> (foram preparadas sete amostras independentes e três réplicas para cada amostra).

A partir dos dados experimentais foi feito o Teste F para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais e o teste t para verificar a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras. O valor médio para a concentração de sibutramina por adição padrão foi de 299,4 mg L<sup>-1</sup>,  $s^2$  foi 22,2 e  $s$  foi igual a 4,7. O valor médio para a concentração de sibutramina pela medição direta da amostra na curva analítica foi de 298,0 mg L<sup>-1</sup>, com valores de  $s^2$  e de  $s$  iguais a 41,0 e 6,4 respectivamente.

O valor de  $F_{tabelado}_{6,6}$  é 4,28 (Anexo 2). O valor de  $F_{calculado}$  foi 1,85. O teste F indica que as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, e que a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração estudado. Como o  $F_{calculado}$  é menor que o  $F_{tabelado}$ , os desvios-padrão dos grupos de teste foram agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras foi testada com a distribuição t de Student.

O valor de  $t_{calculado}$  foi 0,13 ( $1,4/[379,2(0,285)]^{1/2}$ ). O valor de  $t_{tabelado}$  é 2,179 ((2n-2) graus de liberdade e 95% de limite de confiança).

A partir destes resultados, a distribuição t de Student mostrou que a diferença entre as médias obtidas para as análises por adição padrão e por medição direta da amostra na curva analítica não é significativa, sendo apenas devido a erros casuais.

### **3.1.2.5. Precisão**

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos quando uma mesma amostra homogênea é analisada diversas vezes pelo método em questão, sob idênticas condições de análise. As formas mais comuns de expressar a precisão são por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

### 3.2.1.5.1. Repetitividade

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos para uma mesma amostra homogênea analisada, independentemente, diversas vezes sob as mesmas condições (condições experimentais, mesmo analista, mesmo laboratório e mesmo instrumento) em um curto intervalo de tempo.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados, verificando a homo/heterocedasticidade dos resultados da curva analítica ou por testes de variância.

#### 3.2.1.5.1.1. Teste de Homo/Heterocedasticidade

Esse teste verifica a independência/dependência da variância das respostas analíticas obtidas com o método em relação às concentrações das amostras analisadas. A homocedasticidade é verificada através do método de Cochran (Teste G) onde o parâmetro G calculado corresponde a  $s^2_{\text{maior}}/\Sigma s^2$  (variância máxima dividida pelo somatório das variâncias). Os valores de G *tabelado* encontra-se no Anexo 4. Se G *calculado* for maior que o G *tabelado* pode-se dizer que há heterocedasticidade, ou seja, a variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados não é constante. Quando o G *calculado* for menor que o G *tabelado* pode-se dizer que há homocedasticidade, ou seja, a variabilidade dos resíduos segue uma constante.

A homo/heterocedasticidade foi testada a partir dos dados obtidos para preparo da curva analítica (Figura 12). O valor de G *calculado* foi 0,5 (0,5/1,0) e o G *tabelado* (K = 5, graus de liberdade = 3 e limite de confiança de 95%) foi 0,5981.

Como o valor de G *calculado* foi menor que o valor de G *tabelado*, conclui-se que o método pode ser considerado estatisticamente como homocedástico. Este teste foi apenas uma confirmação, uma vez que já havia sido calculado na planilha de Linearidade (Planilha 2).

#### 3.2.1.5.1.2. Repetitividade avaliada pela variância

Para o teste da repetitividade, a determinação do analito na curva analítica foi avaliada no ponto central da curva, que é o procedimento recomendado em Química

Analítica (Peters, 1974) e também para o primeiro e último ponto da curva (7,3; 20,9 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>).

Sete soluções independentes foram preparadas a partir do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>. As soluções foram analisadas em quintuplicata utilizando-se a curva analítica e os resultados obtidos da adição de 250, 750 e 1250 µL do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup> encontram-se nos Anexos 5, 6 e 7 respectivamente. No Anexo 5 são mostrados os resultados das análises das sete soluções para uma adição de 250 µL de padrão de sibutramina, onde se verificou que a concentração média de sibutramina foi 300,0 mg L<sup>-1</sup>. A variância (s<sup>2</sup>) foi de 15,8 e o desvio padrão (s) 3,97. O desvio padrão relativo (DPR) foi de 1,3%. O valor de G *calculado* foi 0,3 (32,3/122,2) e o valor de G *tabelado* (Anexo 4) é igual a 0,4 com K = 7, graus de liberdade (GL) de 5 e limite de confiança de 95%. Conforme os resultados obtidos, todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são estatisticamente equivalentes. Esta afirmação é válida uma vez que o G *calculado* é menor que o G *experimental*.

Considerando os resultados mostrados no Anexo 6 para a adição de 750 µL de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>, foi encontrado uma concentração média de 300,7 mg L<sup>-1</sup> de sibutramina, com s<sup>2</sup> igual a 27,0, s igual a 5,2 e DPR de 1,7%. O valor de G *tabelado* (Para K = 7, GL = 5; 95%) é 0,43. A partir destes resultados, pode-se concluir que todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são equivalentes.

Considerando os resultados mostrados no Anexo 7 para a adição de 1250 µL de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>, foi encontrado uma concentração média de 293,4 mg L<sup>-1</sup> de sibutramina, com s<sup>2</sup> igual a 134,6, s igual a 11,6 e DPR de 4,0%. O valor de G *tabelado* (K = 7, GL= 5; 95%) é 0,43. O valor de G *calculado* foi de 0,4 (32,3/122,2). A partir destes resultados, pode-se concluir que todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são equivalentes.

### **3.2.1.5.2. Precisão intermediária**

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que em um mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. A precisão

intermediária pode ser expressa através da estimativa do valor de DPR dos resultados obtidos em condições de estudo escolhidas para precisão intermediária.

Foram preparadas sete soluções independentes (concentração 300 mg L<sup>-1</sup>) do padrão de sibutramina. As soluções foram analisadas (cinco réplicas para cada amostra independente), ver Anexo 8, utilizando-se a curva analítica da Figura 13. Após sete dias da análise das soluções de sibutramina, sete novas soluções independentes de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas e analisadas (Anexo 9).

Considerando os resultados do primeiro dia mostrados no Anexo 8 para o teste da precisão intermediária, foi encontrado uma concentração média de 300,7 mg L<sup>-1</sup> de sibutramina, com s<sup>2</sup> igual a 27,0, s igual a 5,2 e DPR de 1,7%. Os resultados do segundo dia são mostrados no Anexo 9 sendo encontrado uma concentração média de 300,3 mg L<sup>-1</sup> de sibutramina, com s<sup>2</sup> igual a 33,8, s igual a 5,8 e DPR de 1,9%.

A compatibilidade entre a variância dos dois dias foi testada utilizando-se o Teste F ( $s^2_{\text{maior}}/s^2_{\text{menor}}$ ) ( $n_1 = n_2 = 7$ , GL para numerador e denominador = 6). O valor de F *calculado* foi 1,25(33,8/27). O valor de F *tabelado* (Anexo 2) é 4,28. Portanto, pode-se concluir que como o valor de F *calculado* foi menor que o valor de F *tabelado*, as variâncias dos dois dias são compatíveis e o método proposto possui precisão intermediária satisfatória.

### **3.2.2. Validação para a técnica SWV**

#### **3.2.2.1. Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção foi determinado a partir de adições de pequenos volumes de solução padrão de sibutramina à célula eletrolítica contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0, até a detecção de sibutramina. A quantidade mínima de sibutramina detectada foi de 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

O limite de quantificação foi obtido pela adição de solução padrão de sibutramina à célula eletrolítica contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0, até que a menor quantidade adicionada de sibutramina pudesse ser quantificada. A menor concentração de sibutramina quantificada foi 1,2 mg L<sup>-1</sup>. Este valor foi então certificado pela análise de 10 amostras independentes contendo sibutramina na concentração encontrada. A partir dos resultados obtidos, mostrados no Anexo 10, verificou-se que o valor médio encontrado foi igual a 1,1 mg L<sup>-1</sup> com desvio padrão (s) 0,14 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2.2.2.

#### **Faixa de resposta linear e sensibilidade da resposta analítica da sibutramina por voltametria de onda quadrada**

A faixa de resposta analítica linear foi testada no intervalo de concentração de sibutramina entre 1,1 mg L<sup>-1</sup> (LQ) até 33,3 mg L<sup>-1</sup>. O teste de Jack-Knife (Souza & Junqueira, 2005) foi usado nessa avaliação. Na Planilha 3 é representado o resumo das características para a curva analítica da sibutramina por voltametria de onda quadrada.

A resposta linear da curva analítica de sibutramina na faixa de concentração estudada foi confirmada pelo teste de Jack-Knife. Um valor extremo foi confirmado e retirado (nível 7 da Planilha 3). A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homocedasticidade, a estatística *t* de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson. Os resultados permitem concluir que a significância da regressão foi alta ( $p < 0,001$ ) com desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ). O método está livre de tendência (valor  $p$  da interseção  $> 0,05$ ).

Planilha 3 - Teste de Jack-knife para avaliação da linearidade de 1,1 (LQ) a 33,3 mg L<sup>-1</sup> por voltametria de onda quadrada

Ministério da Saúde		FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		INCQS	
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
<b>AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:					
Data de Confeção da Curva:			Curva N°:		
Replicatas por Nível (k): 1			N° de Níveis (n): 10		
Equipamento:			Responsável:		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc.	Resposta	<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratar de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.	
1	01	1,80E+00	5,00E+00		
2	02	2,40E+00	9,40E+00		
3	03	3,00E+00	1,23E+01		
4	04	4,40E+00	1,75E+01		
5	05	5,90E+00	2,34E+01		
6	06	7,30E+00	3,02E+01		
7	07	1,43E+01	6,11E+01		
8	08	2,09E+01	9,52E+01		
9	09	2,73E+01	1,27E+02		
10	10	3,33E+01	1,54E+02		
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req		0,95			
Rcrit (α = 0,05)		0,91			
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)		1,36			
dL (Limite Inferior) α = 0,05		0,84			
dU (Limite Superior) α = 0,05		1,32			
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada		1,15E+00			
t <sub>L</sub> calculado		3,39E-01			
t <sub>L</sub> tabelado (α = 0,05)		2,36E+00			
p		7,45E-01			
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade p > 0,05					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa p < 0,001					
#DIV/0!					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Não há autocorrelação d > dU					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal Req > Rcrit					
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,60E+04	2,60E+04	2,32E+04	1,38E-13
resíduos	7	7,82E+00	1,12E+00		
Ajuste	4	7,82E+00	1,95E+00	#DIV/0!	#DIV/0!
erro puro	3	0,00E+00	0,00E+00		
total	8	2,60E+04			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA				Pág.:1/1	

De modo similar ao realizado com a voltametria de pulso diferencial, curvas analíticas para sibutramina foram construídas usando a técnica de onda quadrada. Na Tabela 4 são apresentadas as condições experimentais escolhidas para a melhor resposta analítica usando a técnica voltamétrica de onda quadrada.

Curvas analíticas da sibutramina foram construídas, adicionando à célula eletrolítica (contendo 10,0 mL de tampão McIlvaine pH 4,0) cinco alíquotas consecutivas de 250  $\mu\text{L}$  do padrão de sibutramina 300  $\text{mg L}^{-1}$ . As concentrações finais de sibutramina foram 7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3  $\text{mg L}^{-1}$ . Para cada concentração de sibutramina foram feitas quatro réplicas de leitura da corrente. Os valores médios de corrente obtidos (em nA) foram graficados em função da concentração de sibutramina na célula eletrolítica. Na Figura 14 e na Figura 15 são mostrados os voltamogramas e a curva analítica (concentração em  $\text{mg L}^{-1}$  versus corrente em nA) obtidos.

Tabela 4 - Condições escolhidas para a sibutramina na técnica de voltametria de onda quadrada

Eletrólito suporte	Tampão McIlvaine pH 4
Eletrólito de trabalho	HMDE
Potencial de pico	-100 mV
Amplitude	50 mV
Área da gota de mercúrio	0,3187 $\text{mm}^2$
Concentração do padrão	300 $\text{mg L}^{-1}$
Volume da solução padrão	250 $\mu\text{L}$ ( cinco adições)
Volume do eletrólito	10,0 mL
Potencial inicial	140 mV
Potencial final	-700 mV
Tempo de purga	300 s
Velocidade de varredura	240 $\text{mVs}^{-1}$
Incremento de potencial	8 mV
Frequência	30 Hz

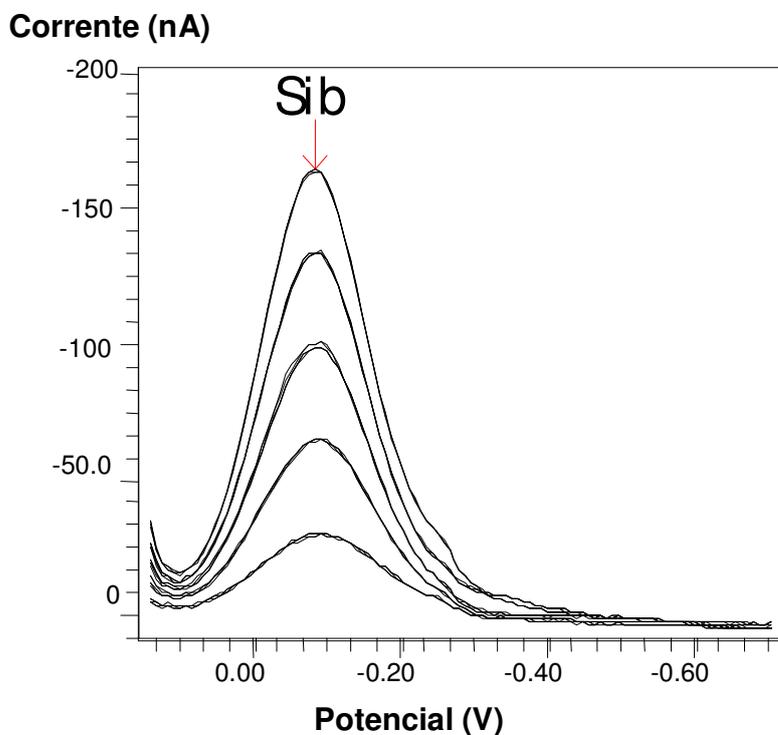


Figura 14 - Voltamograma obtido para o preparo da curva analítica (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>) da sibutramina pela técnica de onda quadrada nas condições descritas na Tabela 4

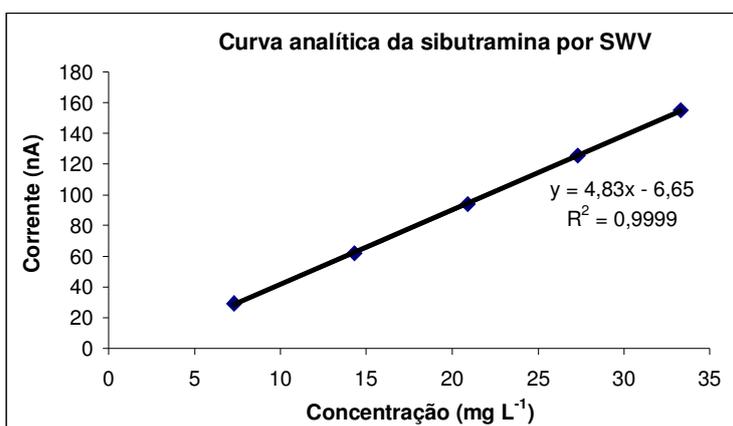


Figura 15 - Curva analítica da sibutramina (7,3 a 33,3 mg L<sup>-1</sup>) por voltametria de onda quadrada realizada de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 4

Como a faixa de trabalho escolhida nas determinações de sibutramina ficou entre 7,3 e 33,3 mg L<sup>-1</sup>, uma nova avaliação de linearidade para a curva neste intervalo de

concentrações específico foi realizada (Planilha 4). A curva analítica obtida foi:  $y = 4,83x - 6,65$  e o valor de  $R^2$  encontrado foi 0,9998.

A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, conforme a Equação 5, indicando um valor igual a  $4,83 \text{ n A L mg}^{-1}$ .

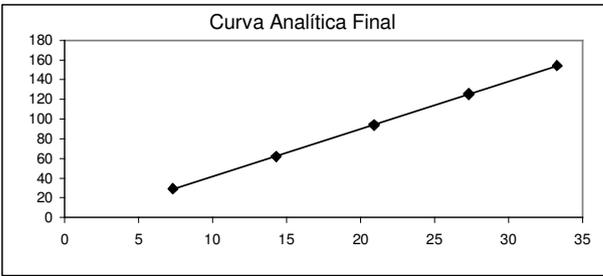
## Planilha 4 - Teste de Jack-knife para a avaliação da linearidade da curva analítica da sibutramina

 Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde			
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA			
<b>Dados da Curva Analítica</b>			
Análise:		Curva N°:	
Data de Confeccção da Curva:		N° de Níveis (n):	
Replicatas por Nível (k): 4		Responsável: 5	
Equipamento:			
<b>Tabela de dados originais</b>			
Nível (k)	i	Conc.	Resposta
1	01	7,32E+00	2,92E+01
	02	7,32E+00	2,95E+01
	03	7,32E+00	2,87E+01
	04	7,32E+00	2,93E+01
2	05	1,43E+01	6,22E+01
	06	1,43E+01	6,16E+01
	07	1,43E+01	6,18E+01
	08	1,43E+01	6,21E+01
3	09	2,09E+01	9,46E+01
	10	2,09E+01	9,32E+01
	11	2,09E+01	9,33E+01
	12	2,09E+01	9,48E+01
4	13	2,73E+01	1,26E+02
	14	2,73E+01	1,25E+02
	15	2,73E+01	1,26E+02
	16	2,73E+01	1,25E+02
5	17	3,33E+01	1,57E+02
	18	3,33E+01	1,54E+02
	19	3,33E+01	1,55E+02
	20	3,33E+01	1,54E+02

**Avaliação de Valores Extremos**  
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

**Curva Analítica Final**



**Gráfico de Resíduos**



**Normalidade dos Resíduos**  
(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,95

**Autocorrelação dos Resíduos**  
(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,41
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

**Análise de Regressão Linear (Modelo:  $Y = a + bX$ )**  
*Estadísticas da Regressão*

Coefficiente Angular (b):	4,83E+00	Coefficiente Linear (a):	-6,65E+00
r	0,9999	R <sup>2</sup>	0,9998
N	19	Graus de Liberdade	17

**ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)**

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,55E+04	3,55E+04	8,86E+04	4,84E-33
resíduos	17	6,80E+00	4,00E-01		
Ajuste	4	2,99E+00	7,48E-01	2,55E+00	8,94E-02
erro puro	13	3,81E+00	2,93E-01		
total	18	3,55E+04			

**Resumo da Avaliação**

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

**Observações**

Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### 3.2.2.3. Exatidão

Para se verificar a exatidão do método proposto para a sibutramina, preparou-se uma solução  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  a partir de uma amostra de medicamento contendo sibutramina (Biomag<sup>®</sup>) e comparou-se a média de sete medições do valor encontrado para esta solução após interpolação na curva analítica ( $y \text{ (nA)} = 1,798x \text{ (mg L}^{-1}) - 2,188$ ) com o valor verdadeiro ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). A porcentagem de recuperação do método de análise, ou seja, sua exatidão foi de 90,4%.

### 3.2.2.4. Seletividade/Especificidade

Para este estudo foi feita a análise do medicamento Sandoz<sup>®</sup> 15 mg lote 41748R por adição padrão e por interpolação da corrente correspondente da amostra contendo sibutramina na curva analítica para verificar se a matriz influenciavam diretamente nas análises. A concentração do padrão preparada foi de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e a concentração da amostra (Sandoz<sup>®</sup>)  $300 \text{ mg L}^{-1}$  (foram preparadas sete amostras independentes e três replicas para cada amostra). O volume da amostra adicionado foi  $700 \mu\text{L}$ .

A partir dos dados experimentais foi feito o Teste F para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais e o teste t para verificar a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras. O valor médio para a concentração de sibutramina por adição padrão foi  $294,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $s^2$  igual a 112,2 e s igual a 10,6. O valor médio para a concentração de sibutramina pela medição direta da amostra na curva analítica foi de  $296,6 \text{ mg L}^{-1}$  com  $s^2$  igual a 84,9 e s igual a 9,2.

O Teste F foi usado para avaliar a seletividade do método de análise da sibutramina, ou seja, se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais.

O valor de  $F_{\text{tabelado}}_{6,6}$  é 4,28 (Anexo 2). O valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi 1,3. O teste F indicou que as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, e que a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração estudado. Como o  $F_{\text{calculado}}$  é menor que o  $F_{\text{tabelado}}$ , os desvios- padrão dos grupos de teste foram agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras foi testada com a distribuição t de Student.

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  foi 0,14 ( $2,6/[1180,8 (0,286)]^{1/2}$ ). O valor de  $t_{\text{tabelado}}$  é 2,179 ((2n-2) graus de liberdade e 95% de limite de confiança).

A partir destes resultados, a distribuição t de Student mostrou que a diferença entre as médias obtidas para as análises por adição padrão e por medição direta da amostra na curva analítica não é significativa, sendo apenas devido a erros casuais.

#### **3.2.2.5.1.1.**

##### **Teste de Homo/Heterocedasticidade**

A Homo/Heterocedasticidade foi testada a partir dos dados obtidos para preparo da curva analítica (Figura 16). O valor de *G calculado* foi 0,53 (1,7/3,2) e o *G tabelado* (K = 5, GL = 3; 95%) foi 0,5981

Como o valor de *G calculado* foi menor que o valor de *G tabelado*, conclui-se que o método pode ser considerado estatisticamente como homocedástico. Este teste foi apenas uma confirmação, uma vez que já havia sido calculado na planilha de Linearidade (Planilha 4).

#### **3.2.2.5.1.2.**

##### **Repetitividade avaliada pela variância**

As sete soluções independentes foram preparadas a partir do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>. As soluções foram analisadas em quintuplicata utilizando-se a curva analítica e os resultados obtidos da adição de 250, 750 e 1250 µL do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup> encontram-se nos anexos 11, 12 e 13 respectivamente. No Anexo 11 são mostrados os resultados das análises das sete soluções para uma adição de 250 µL de padrão de sibutramina, onde verificou-se uma concentração média de sibutramina de 302,2 mg L<sup>-1</sup>. A variância (*s*<sup>2</sup>) foi de 28,2 e o desvio padrão (*s*) 5,3. O desvio padrão relativo (DPR) foi de 1,8%. O valor de *G calculado* foi 0,2 (4,8/20,3) e o valor de *G tabelado* (Anexo 4) (K = 7, GL = 5; 95%) é 0,4. Conforme os resultados obtidos, todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são estatisticamente equivalentes. Esta afirmação é válida uma vez que o *G calculado* é menor que o *G tabelado*.

A partir dos resultados mostrados no Anexo 12 para a adição de 750 µL de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup>, foi encontrado uma concentração média de 300,0 mg L<sup>-1</sup> de sibutramina, com *s*<sup>2</sup> igual a 15,5, *s* igual a 3,9 e DPR de 1,3%. O valor de *G tabelado* (Para K = 7, GL = 5; 95%) é 0,43. O valor de *G calculado* foi 0,3 (4,0/12,3). A partir destes resultados, pode-se concluir que todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são equivalentes.

A partir dos resultados mostrados no Anexo 13 para a adição de 1250  $\mu\text{L}$  de sibutramina 300  $\text{mg L}^{-1}$ , foi encontrado uma concentração média de 300,5  $\text{mg L}^{-1}$  de sibutramina, com  $s^2$  igual a 9,1,  $s$  igual a 3,0 e DPR de 1,0%. O valor de  $G$  *tabelado* (Para  $K = 7$ ,  $GL = 5$ ; 95%) é 0,43. O valor de  $G$  *calculado* foi de 0,4 (2,2/6,2). A partir destes resultados, pode-se concluir que todas as variâncias calculadas a partir dos resultados experimentais são equivalentes.

### 3.2.2.5.2. Precisão Intermediária

Sete soluções independentes (concentração 300  $\text{mg L}^{-1}$ ) do padrão de sibutramina foram preparadas e analisadas (cinco réplicas para cada amostra independente) (Anexo 14) utilizando-se interpolação dos resultados na curva analítica. Após sete dias da análise das soluções de sibutramina, sete novas soluções independentes de sibutramina 300  $\text{mg L}^{-1}$  foram preparadas e analisadas (Anexo 15).

A partir dos resultados do primeiro dia mostrados no Anexo 14 para o teste da precisão intermediária, foi encontrado uma concentração média de 300,0  $\text{mg L}^{-1}$  de sibutramina, com  $s^2$  igual a 15,5,  $s$  igual a 3,9 e DPR 1,3%. Os resultados do segundo dia são mostrados no Anexo 15 sendo encontrado uma concentração média de 299,3  $\text{mg L}^{-1}$  de sibutramina, com  $s^2$  igual a 36,1,  $s$  igual a 6,0 e DPR de 2,0%.

A compatibilidade entre a variância dos dois dias foi testada utilizando-se o Teste  $F$  ( $s^2_{\text{maior}}/s^2_{\text{menor}}$ ) ( $n_1=n_2=7$ , grau de liberdade para numerador e denominador = 6). O valor de  $F$  *calculado* foi 1,3 (36,1/28,2). O valor de  $F$  *tabelado* (Anexo 2) é 4,28. Portanto, pode-se concluir que como o valor de  $F$  *calculado* é menor que o valor de  $F$  *tabelado*, as variâncias dos dois dias são compatíveis e o método proposto possui precisão intermediária satisfatória.

### 3.3. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi usada neste trabalho com o intuito de se fazer um estudo do comportamento eletroquímico da sibutramina, para que informações como número de elétrons envolvidos no processo de redução da sibutramina e a reversibilidade da reação fossem estudadas.

O estudo do comportamento eletroquímico da sibutramina foi realizado usando tampão Mvllvaine pH 4,0 e padrão de sibutramina 14,3  $\text{mg L}^{-1}$ . Conforme pode ser visto

na Figura 16, a reação eletroquímica da sibutramina é aparentemente reversível, com um pico catódico no potencial de -132 mV e um pico anódico em -74 mV.

A diferença entre os potenciais dos picos anódicos e catódicos foi usada para identificar o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica de interesse. De acordo com a Equação 3 mostrada anteriormente, pode-se estimar o número de elétrons envolvidos na reação.

$$\Delta E_p = E_a - E_c = -74 - (-132) = 59/n$$

$$\Delta E_p = E_a - E_c = 58 = 59/n$$

Logo,  $n = 1$  = número de elétrons envolvidos na reação.

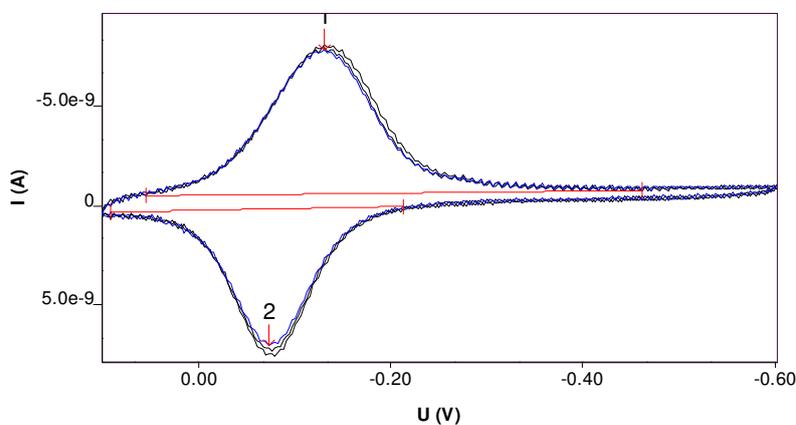


Figura 16 - Voltamograma cíclico aparentemente reversível da sibutramina  $14,3 \text{ mg L}^{-1}$ ; tampão McIlvaine pH 4,0; velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e 3 mV voltag step