

3

Resultados e discussão – características fosforescentes dos anticancerígenos e otimizações

3.1. Estudos preliminares dos anticancerígenos

A primeira etapa do processo de desenvolvimento dos métodos fosforimétricos foi um estudo para a prospecção das características espectrais em diferentes condições experimentais de tal forma a identificar condições que produzissem sinais analíticos relevantes para a(s) espécie(s) de interesse e que minimizassem os sinais de potenciais substâncias interferentes. Sendo assim, um estudo prévio foi realizado para encontrar condições experimentais para indução de fosforescência na temperatura ambiente e viabilizar a determinação de anticancerígenos (CPT, CPT-11 e TPT). Inicialmente, em todos os estudos, os parâmetros instrumentais foram fixados como indicado a seguir: tempo de abertura do detector (3 μ s), tempo de atraso do detector (3 μ s), velocidade de varredura (1500 nm min⁻¹) e bandas espectrais de passagem de excitação e emissão (ambas 10 nm).

As soluções de CPT foram preparadas em metanol / água 30/70% v/v. As soluções de CPT-11 e de TPT foram preparadas com água ultrapurificada. Quando necessário, alíquotas de NaOH ou de HCl foram adicionadas às soluções de modo a modificar a acidez e basicidade do meio.

Fosforescências da CPT, CPT-11 e TPT não foram observadas quando essas substâncias foram colocadas diretamente nos substratos de celulose. Assim, avaliou-se o efeito de seis sais átomos pesados (AP): TlNO₃ (332 μ g), Pb(NO₃)₂ (414 μ g), AgNO₃ (8 μ g), CdCl₂ (503 μ g), HgCl₂ (339 μ g) e KI (166 μ g), no substrato de celulose onde os anticancerígenos foram depositados. Os seis sais de AP foram escolhidos por serem os tradicionalmente usados no desenvolvimento de métodos por SS RTP. A avaliação preliminar das substâncias foi realizada em três tipos de soluções carreadoras: (i) meio natural da solução, (ii) meio ácido na concentração final de HCl 0,1 mol L⁻¹ e (iii) meio básico na concentração final de de NaOH 0,1 mol L⁻¹. O efeito de um modificador de superfície, SDS, nos substratos também foi avaliado. Adicionalmente, nas

condições que os anticancerígenos apresentaram sinal fosforescente, o efeito do tratamento fotoquímico (radiação UV) foi avaliado.

Os resultados desses estudos preliminares encontram-se na Tabela 2 e na Tabela 3. Sendo os valores apresentados na Tabela 3, a razão da intensidade de sinal fosforescente obtidos na presença e na ausência do modificador de superfície.

Tabela 2: Estudo do efeito de sais de átomos pesados no sinal fosforescente da irinotecana (CPT-11), camptotecina (CPT) e topotecana (TPT) em substrato de celulose^a.

Anticancerígenos	Meio ^e	Sais de átomos pesados ^b					
		$I_a - I_b$ (u.a.) ^c					
		$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm) ^d					
		AgNO ₃	TiNO ₃	KI	HgCl ₂	Pb(NO ₃) ₂	CdCl ₂
CPT-11	Natural	42 370/550	44 370/550	-	-	70 367/540	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	- ^f	21 379/550	-	-	73 367/540	-
CPT	Natural	25 377/573	63 367/560	-	-	31 367/540	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	- ^f	110 367/560	-	- ^g	70 367/540	-
TPT	Natural	64 370/585	21 380/570	-	-	18 375/580	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	-	35 429/629	-	-	105 394/597	-

^a analitos na concentração de 4×10^{-4} mol L⁻¹

^b massas depositadas no substrato a partir de 5 μ l de solução: TiNO₃ (332 μ g), Pb(NO₃)₂ (414 μ g), AgNO₃ (8 μ g), CdCl₂ (503 μ g), HgCl₂ (339 μ g) e KI (166 μ g).

^c $I_a - I_b$: Sinal fosforescente líquido (sinal do analito – sinal do ensaio em branco).

^d $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm): comprimentos de onda de excitação e de emissão.

^e solução carreadora de analito para a CPT-11 e TPT : 100% água ultrapurificada; para a CPT: metanol/água ultrapurificada 30/70% v/v.

^f observada presença de precipitado marrom.

^g observada presença de precipitado amarelo.

Tabela 3: Estudo do efeito de sais de átomos pesados no sinal fosforescente da irinotecana (CPT-11), camptotecina (CPT) e topotecana (TPT) em substrato de celulose na presença de SDS (360 µg)^a.

Anticancerígenos	Meio ^e	Sais de átomos pesados ^b					
		$I_{AP/SDS} / I_{AP}$ ^c					
		$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm) ^d					
	AgNO ₃	TiNO ₃	KI	HgCl ₂	Pb(NO ₃) ₂	CdCl ₂	
CPT-11	Natural	2,9 370/550	2,3 370/550	-	-	13,0 370/540	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	- ^f	9,1 379/550	-	- ^g	12,4 370/540	-
CPT	Natural	1,2 370/570	1,5 370/550	-	-	1,8 367/540	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	- ^f	1,2 370/570	-	- ^g	1,0 367/540	-
TPT	Natural	0,9 370/585	4,0 370/580	-	-	8,0 374/560	-
	Ácido	-	-	-	-	-	-
	Básico	-	3,5 429/629	-	-	2,0 394/597	-

^a analitos na concentração de 4×10^{-4} mol L⁻¹

^b massas depositadas no substrato a partir de 5 µl de solução: TiNO₃ (332 µg), Pb(NO₃)₂ (414 µg), AgNO₃ (8 µg), CdCl₂ (503 µg), HgCl₂ (339 µg) e KI (166 µg)

^c I_{com} / I_{sem} - valor da razão da intensidade de sinal fosforescente obtidos na presença e na ausência do modificador de superfície.

^d $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm): comprimentos de onda de excitação e de emissão.

^e solução carreadora de analito para a CPT-11 e TPT : 100% água ultrapurificada; para a CPT: metanol/água ultrapurificada 30/70% v/v.

^f observada presença de precipitado marrom.

^g observada presença de precipitado amarelo.

3.1.1. Efeito externo do átomo pesado

Na Tabela 2 observa-se que a CPT fosforesce apenas na presença de três diferentes sais de AP: TlNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e AgNO_3 . Na presença do sal de $\text{Ag}(\text{I})$ somente foi observada a fosforescência com o analito preparado em metanol/água (meio original da solução), diferentemente dos outros dois sais de AP que apresentaram sinal quando colocados no substrato a partir de soluções preparadas em metanol/água e em metanol/ NaOH . No caso dos substratos contendo $\text{Tl}(\text{I})$, observou-se um aumento relevante do sinal da CPT quando este foi depositado a partir de solução carreadora em meio básico. Essa diferença de sinal da CPT em relação ao meio provavelmente é justificada pela abertura do anel lactônico da CPT num processo onde o equilíbrio entre as duas formas (lactônica e carboxilada) é dependente do valor do pH do meio. Em condições ácidas ($\text{pH} < 5$) a estrutura lactônica é predominante, enquanto que em valores de $\text{pH} > 8$, a forma do anel aberto (carboxilado) é predominante. Em pH fisiológico (pH aproximadamente 7,4), o equilíbrio se processa em favor da conversão para a forma carboxilada. Por isso, é de grande interesse o estudo do pH da solução carreadora do analito para a CPT⁷³.

No caso da CPT-11 o efeito externo do átomo pesado também ocorreu na presença dos mesmos três sais de APs (TlNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e AgNO_3) os quais promoveram o cruzamento intersistemas e o aumento da taxa de desativação radiativa tripleto-singlete da substância. Foi possível observar fosforescência da CPT-11 no papel filtro contendo o sal de $\text{Ag}(\text{I})$ quando depositado no substrato a partir da solução aquosa original. Para os demais sais de AP, o sinal da CPT-11 foi observada tanto a partir da solução original (CPT-11 em água) quanto a partir da solução contendo NaOH .

Assim, como para os outros anticancerígenos, para a TPT a fosforescência foi observada na presença de $\text{Ag}(\text{I})$ (somente para o analito depositado no substrato a partir da solução aquosa) e na presença do sal de $\text{Tl}(\text{I})$ ou de $\text{Pb}(\text{II})$ tanto a partir de soluções preparadas diretamente em água quanto de soluções preparadas em NaOH .

3.1.2.Efeito do SDS

O surfactante SDS é usado principalmente para modificar a superfície da celulose implicando, muitas vezes, em melhor condição para imobilização do analito. O SDS também pode promover maior interação entre o analito e os íons de átomo pesado, implicando em um efeito externo do átomo pesado mais eficiente e conseqüentemente em sinais fosforescentes mais intensos. O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem nos poros da celulose, facilitando a interação destas moléculas com a superfície do papel⁷⁴. Assim, um estudo do efeito do modificador de superfície foi realizado com os três anticancerígenos.

Avaliando a Tabela 2 e a Tabela 3, a fosforescência da CPT na presença de SDS (360 µg) foi melhorada em fatores discretos e iguais a 1,2 vezes em substratos contendo Ag(I) e 1,8 vezes em substratos contendo Pb(II), em ambos os casos, a solução do analito foi preparada em metanol/água. Com o sal de AP de Tl(I), o comportamento foi similar com aumento do sinal de 1,5 e 1,2 vezes a partir de soluções de analito preparadas em metanol/água e metanol/NaOH, respectivamente. Em todos os casos, o uso do SDS não apresentou nenhum impacto relevante na intensidade da fosforescência.

No caso da CPT-11 em substratos contendo o modificador de superfície, foi observado um aumento de sinal de 2,9 vezes na presença de Ag(I), a partir de soluções de analito preparadas em água, e 2,3 e 9,1 vezes em substratos contendo TlNO₃ nos casos de adição de analito no substrato a partir de soluções preparadas em água e em água/NaOH, respectivamente. Nesse último caso, constatou-se que o SDS promoveu aumento significativo (quase uma ordem de grandeza) do sinal da CPT-11. Na presença do sal de Pb(II), a amplificação foi ainda maior, 13,0 e 12,4 vezes respectivamente para os casos de adição de analito no substrato a partir de solução preparada em água e água/NaOH, indicando provavelmente que o SDS promoveu uma melhor interação entre o analito e o AP.

Para a TPT, em substratos contendo SDS, a amplificação do sinal aconteceu com os sais de Tl(I) e de Pb(II). Na presença de TlNO₃ o aumento obtido de sinal foi relevante, sendo igual a 4,0 vezes para o caso de adição de analito no substrato a partir de solução preparada em água e 3,5 vezes no caso de solução preparada em água/NaOH. Os aumentos de fosforescência de TPT em substratos contendo SDS e Pb(II) foram de 8,0 e 2,0 vezes para os casos de

adição de analito no substrato a partir de solução preparada em água e de água/NaOH, respectivamente.

O comportamento observado para a CPT-11 e para a TPT com a grande amplificação de sinal em substratos com SDS é relativamente comum, em especial na presença de Tl(I) visto que o surfactante promove maior aproximação entre as moléculas do analito e do átomo pesado, aumentando a probabilidade de acoplamento spin-orbital, amplificando assim o sinal fosforescente. Trabalhos realizados por Arruda e Aucélio⁷⁰ na determinação seletiva de ioimbina, com o $TlNO_3$ na presença de SDS confirmam este fenômeno.

3.1.3. Estudo da influência do tratamento fotoquímico (radiação UV)

As soluções de CPT, CPT-11 e TPT foram expostas à radiação UV por aproximadamente 30 min em tubos de quartzo, antes de serem depositadas nos substratos de celulose previamente tratados com os sais de AP. Substratos contendo surfactante (SDS) também foram testados. Em nenhuma das situações foi observado aumento do sinal dos analitos ou mudanças das outras características espectrais após a exposição à radiação UV, exceto para a CPT-11 na presença do sal de Pb(II) em substratos previamente tratados com SDS. Nesse caso, se observou uma amplificação (em torno de 2 vezes) do sinal do analito, porém a grande variabilidade na intensidade do sinal após exposição ao UV inviabilizou a continuidade deste estudo.

3.1.4. Considerações sobre o estudo preliminar

Este presente trabalho teve como objetivo, primeiramente, desenvolver um método baseado na SSRTP para determinação de contaminações de CPT em formulações anticâncer contendo CPT-11 ou TPT como princípios ativos. Paralelamente, escolheu-se um dos derivados da CPT, no caso CPT-11 por conta da intensa fosforescência obtida, para desenvolver um método analítico fosforimétrico para sua quantificação como componente principal em medicamento anticâncer. Nesse trabalho, a TPT foi tratada apenas como parte da matriz da qual se pretendeu realizar a determinação da CPT. A preocupação de se avaliar a potencial interferência do sinal da TPT no sinal da CPT-11 não foi considerada, pois estes dois alcalóides nunca estariam juntos na mesma

composição farmacêutica. Baseado nessas premissas avaliou-se os resultados dos estudos preliminares.

No estudo preliminar se observou que os mesmos sais de AP, Tl(I), Pb(II) e Ag(I), induziram fosforescência da CPT e de seus dois derivados. De fato, ao se observar a Figura 14 e a Figura 15 vê-se que os espectros dos três alcalóides são muito similares nas presenças de Tl(I) e do Pb(II), o que implica em não seletividade por meio do efeito externo do AP, recurso este muito útil em fosforimetria. Os espectros dos alcalóides na presença de Ag(I) não são mostrados, pois do ponto de vista prático, este AP provocou formação de filme negro (redução fotoquímica do AgNO_3) na superfície do substrato, que degradou a precisão das medições. Assim sendo, duas condições foram selecionadas para o prosseguimento desse trabalho. A primeira condição foi aquela que apresentou maior fosforescência da CPT-11, isto é, na presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em substratos contendo SDS. Nessa condição, os espectros apresentaram comprimentos de onda máximos de excitação/emissão em 370/540 nm. A segunda condição foi aquela na qual a CPT apresentou fosforescência mais intensa, isto é, em substratos de papel contendo TlNO_3 onde a fosforescência máxima observada foi em 370/570 nm. Nos dois casos, um estudo mais cuidadoso do efeito do pH da solução carreadora foi necessário como será mostrado ao longo da otimização do método.

Embora não se tenha conseguido uma condição seletiva óbvia para a determinação de CPT (possível contaminante nas formulações farmacêuticas) na presença de CPT-11 ou de TPT, esforços, tais como o ajuste de parâmetros e recursos instrumentais ainda serão realizados visando à determinação seletiva. Tratamentos espectrais tais como as de derivada de ordem superior são muito úteis em casos como estes, pois permitem o encontro de pontos isodiferenciais (comprimentos de onda seletivos) a partir de pequenas diferenças nos espectros do analito de interesse em relação aos dos potenciais interferentes.

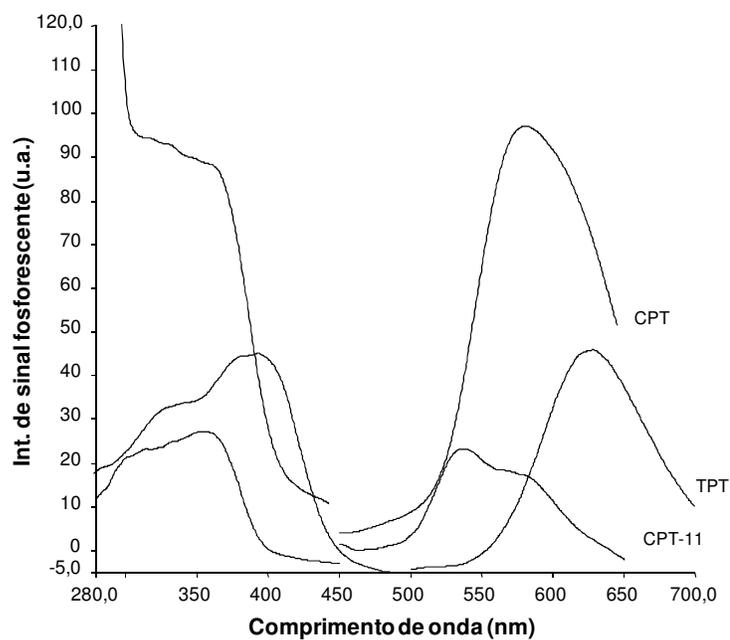


Figura 13: Espectros dos três alcalóides ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença do AP de TI(I) ($332 \mu\text{g}$).

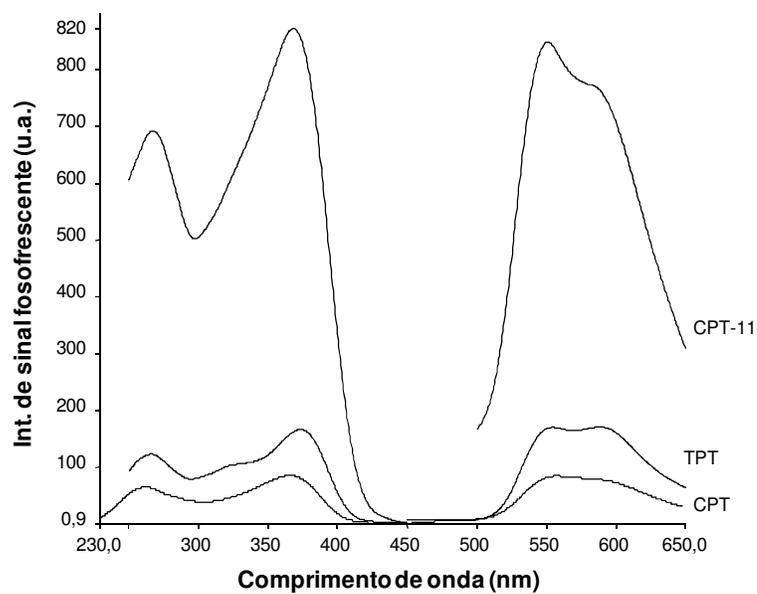


Figura 14: Espectros dos três alcalóides ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença Pb(II) ($414 \mu\text{g}$) em substratos contendo SDS($360 \mu\text{g}$).

3.2. Maximização da fosforescência

3.2.1. Estudos univariados com a CPT

Após a avaliação das características fosforescentes, as condições experimentais mais promissoras, do ponto de vista da melhor sensibilidade do método para a CPT, foram selecionadas para um ajuste mais refinado, inicialmente por meio de otimização univariada.

Primeiramente foi realizado um estudo para a avaliação da solubilidade. Em seguida, o valor do pH da solução carreadora e a massa de TINO_3 depositada no substrato foram estudadas. A magnitude da fosforescência de uma substância em substrato de papel depende substancialmente das quantidades relativas de coadjuvantes adicionados no substrato (sal de AP indutor de fosforescência e modificador químico de superfície) assim como condições da solução carreadora (no caso a composição do sistema de solventes e pH do meio). Compreender o comportamento da fosforescência dos analitos em substrato sólido, em função das variáveis mencionadas é crucial para o alcance de melhor relação sinal-ruído, em especial no caso do substrato de celulose, cujo sinal de fundo pode também ser afetado por esses mesmos parâmetros.

3.2.1.1. Solubilidade

Como mencionado anteriormente, a CPT é um alcalóide natural muito pouco solúvel em água e, por esta razão, a solução da CPT foi inicialmente preparada em metanol/água 30/70% v/v¹⁸. Contudo esta solução apresentou-se parcialmente turva. Decidiu-se fazer um estudo da solubilidade da CPT em diferentes proporções de metanol/água, onde a proporção do metanol foi variada na faixa entre 0 e 100%, em volume, de modo a se avaliar a relação entre o aumento da proporção do solvente orgânico e o sinal medido no substrato. É importante salientar que o sistema de solvente pode influenciar o resultado de duas maneiras: a primeira e mais óbvia é a questão da solubilidade propriamente dita, na qual o analito deve ser totalmente dissolvido de modo a ser carreado para o substrato a partir de uma solução homogênea. Em segundo lugar, a polaridade do solvente influencia na estrutura da superfície do substrato de celulose, em especial, no tamanho dos poros do mesmo, que, por conseguinte, controla a imobilização do analito e quão fundo no substrato o analito pode penetrar.

Na Figura 16, pode-se observar a amplificação da fosforescência com o aumento do percentual de metanol na solução. Verificou-se que a fosforescência da CPT teve um aumento em torno de 10 vezes usando 100% de metanol no preparo da solução em relação ao meio totalmente aquoso. Nesse caso, concluiu-se que o fator preponderante na escolha da composição do solvente foi a questão da solubilidade, pois a turvação da solução de analito, fato que indica a solubilização incompleta da CPT, só foi eliminada visualmente a partir de soluções contendo 70% de metanol.

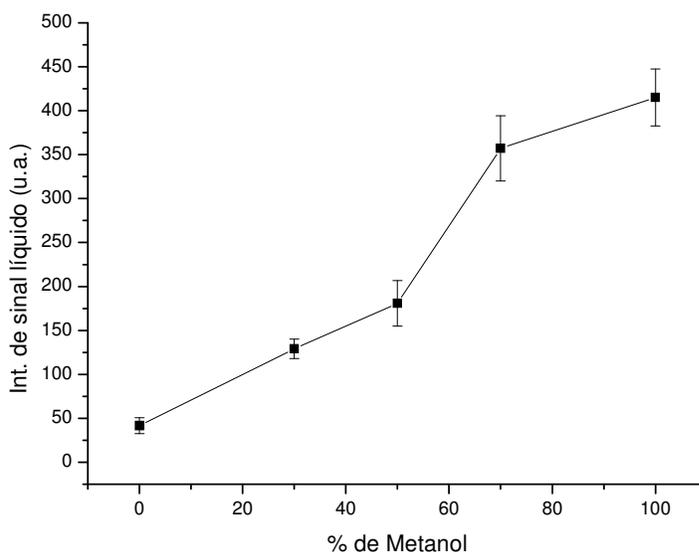


Figura 15: Influência da proporção de metanol no sistema de solventes da solução carreadora na fosforescência da CPT (111 ng) em substratos de celulose contendo nitrato de tálio (332 µg).

3.2.1.2. pH da solução carreadora de analito

Nos estudos preliminares, a mudança do pH da solução carreadora de analito influenciou significativamente a magnitude da fosforescência da CPT em substratos contendo Tl(I), provavelmente pela estrutura da CPT se alterar significativamente em função do pH do meio em que se encontra dissolvida (equilíbrio entre a forma lactônica e a forma carboxilada). Por isso, um estudo univariado foi realizado utilizando CPT dissolvido em soluções preparadas em tampão Britton-Robinson ajustado em valores de pH entre 2 e 12 (Figura 17). A partir de soluções preparadas em pH 2 não foi observada nenhuma

fosforescência, no entanto um aumento significativo do sinal ocorreu quando o valor pH se elevou para 3, mantendo-se constante até o pH fisiológico (7). Na faixa básica, observou-se uma amplificação, em torno de 2 vezes, na intensidade da fosforescência, onde o sinal manteve-se constante e com pouca variabilidade a partir de soluções carreadoras com valores de pH entre 9 e 12, faixa essa podendo ser considerada robusta. A partir do pH 12 uma queda na intensidade de sinal foi observada. Avaliando os resultados da Figura 17, o uso do tampão Britton-Robinson torna-se relevante e o pH escolhido para continuidade dos estudos foi o 10,5 (no meio da faixa robusta), na qual predomina-se a forma carboxilada da CPT.

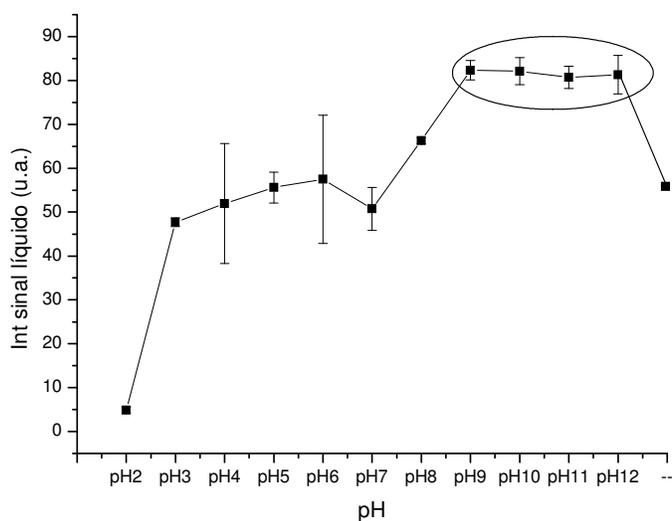


Figura 16: Influência da variação do pH na fosforescência o sinal fosforescente da CPT (111 ng) em substratos de celulose contendo nitrato de tálio (332 μg).

3.2.1.3. Massa de sal de átomo pesado no substrato

O átomo pesado atua aumentando a velocidade do cruzamento entre os estados excitados singleto e tripleto e na eficiência da desativação radiativa do estado tripleto (fosforescência). Como a magnitude da amplificação da fosforescência medida em substrato é dependente da quantidade de indutor, fez-se necessário a otimização desse parâmetro experimental.

As soluções de CPT ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram depositadas (5 μL) em substratos de celulose contendo, na área de deposição da solução de analito, diferentes quantidades de TINO_3 (0 a 996 μg). Massas de TINO_3 até 332 μg foram depositadas a partir de uma única adição de 5 μL da solução do sal de

átomo pesado. Para massas maiores de 322 μg (no caso, 664 e 996 μg), adições múltiplas de 5 μL foram utilizadas, por causa da limitação da solubilidade do TINO_3 em água. De acordo com os resultados (Figura 18), a fosforescência da CPT foi mais intensa em substratos contendo 332 μg de TINO_3 . De fato, a faixa entre os valores de 200 e 332 μg de TINO_3 pode ser considerada robusta. A partir de 332 μg , uma queda considerável de sinal foi observada, devido provavelmente a formação de um filtro absorvente ou bloqueio da radiação de excitação (efeito filtro).

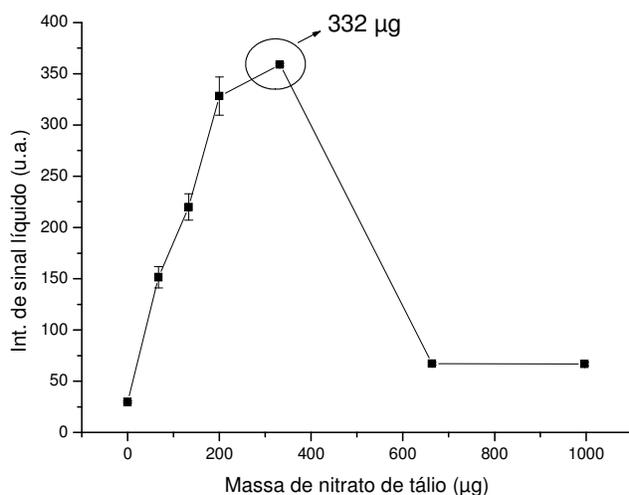


Figura 17: Estudo do efeito da massa de TINO_3 presente no substrato de celulose na fosforescência da CPT (111 ng).

3.2.1.4. Presença de SDS no substrato de celulose

A presença de modificadores de superfície (SDS) pode proporcionar a amplificação de fosforescência de espécies químicas principalmente devido a melhora nas interações entre o analito, sal de átomo pesado e substrato sólido. Outros efeitos decorrentes do modificador químico são (i) aumento dos sítios de interação com o substrato sólido, melhorando a imobilização do mesmo e (ii) impedimento da penetração do analito nas camadas mais profundas do substrato, onde o mesmo ficaria fora do alcance da radiação incidente. Esse efeito é bastante dependente da quantidade do modificador no local onde a solução do analito é aplicada⁶⁸.

Para a CPT, o estudo foi realizado com substratos contendo 332 μg de TINO_3 e massas de SDS que variaram de 0 a 760 μg (no centro do substrato). Nesse caso, a fosforescência da CPT aumentou discretamente (máximo de 1,5

vezes) na presença de SDS, como já havia sido verificado no estudo preliminar, não justificando a inclusão desse modificador no procedimento experimental para a CPT.

3.2.2. Estudo multivariado (planejamento fatorial composto central) para a CPT

A análise multivariada vem sendo amplamente utilizada para identificar as variáveis que exercem maiores influências no desempenho de um determinado processo. O planejamento experimental é uma técnica bastante utilizada quando se deseja estudar os efeitos principais e efeitos de interação dos fatores de resposta. O planejamento composto central permite amostrar um conjunto de pontos (nove no caso do planejamento 3^2) que ao serem analisados em conjunto, permitem a construção de uma superfície de resposta analítica em função da variação dos fatores experimentais. A partir da associação do planejamento fatorial com a técnica de superfície de resposta é possível propor um modelo matemático que relacione a resposta em função das variáveis estudadas, determinando assim a faixa ótima para a obtenção da melhor resposta analítica. Esse tipo de avaliação permite também verificar se a contribuição do efeito na resposta é linear ou de ordem superior (mais especificamente a quadrática).

O planejamento fatorial é mais efetivo quando se têm informações prévias do sistema a ser estudado, pois isso permite a escolha apropriada das regiões de resposta mais relevantes para cada fator.

Este estudo multivariado é considerado crucial para a CPT, pois se pretende quantificá-lo em baixos teores, na ordem de μg ou ng , nas formulações farmacêuticas.

Neste trabalho, os resultados dos estudos univariados permitiram uma seleção efetiva dos níveis de cada um dos fatores que serão estudados. Com base nesses resultados observou-se que o pH da solução carreadora de analito e a quantidade de $\text{Ti}(\text{I})$ depositada no substrato foram relevantes na intensidade de sinal da CPT, optando-se por realizar um planejamento fatorial composto central com esses 2 fatores (2^2). Os níveis (-1), (+1) e (0) para cada fator foram selecionados com base nas tendências indicadas nos estudos univariados, já os níveis $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$ foram obtidos de acordo com o indicado pelo design característico desse planejamento. Em geral, recomenda-se para o planejamento composto central, o uso de cinco replicatas das medições no ponto central (0,0),

cuja variância seria característica para todo o sistema. Assim sendo, para os outros oito pontos do planejamento $\{(+1,-1); (-1,+1), (+1,+1); (-1,-1); (0,+\sqrt{2}); (0,-\sqrt{2}); (+\sqrt{2},0)$ e $(-\sqrt{2},0)\}$ apenas uma medição bastaria. No entanto, no caso da fosforimetria, decidiu-se por utilizar seis replicatas no ponto central e três replicatas para cada um dos outros pontos. Essa decisão foi baseada no histórico de não uniformidade dos substratos que afeta a variância associada às medições usando essa técnica (identificação das variações não-aleatórias do sinal, características da medição fosforescente em substrato de celulose).

No caso da massa de TINO_3 , os valores para os níveis foram: 186 μg $(-\sqrt{2})$; 213 μg (-1) ; 266 μg (0) ; 332 μg $(+1)$ e 346 μg $(+\sqrt{2})$. Já os valores de pH foram: pH 8.4 $(-\sqrt{2})$; pH 9.0 (-1) ; pH 10.5 (0) ; pH 12.0 $(+1)$ e pH 12.6 $(+\sqrt{2})$. A matriz do planejamento bem como a análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa Statistica 6.0 utilizando nível de 95% de confiança. A ordem de realização dos 30 experimentos foi gerada pelo programa, de forma aleatória. Os resultados estão indicados na Tabela 4. A massa do analito depositada no substrato de papel foi de 111 ng (5 μL da solução $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

O gráfico de Pareto (Figura 19) indica os efeitos que são estatisticamente significativos no modelo. Por este gráfico, as barras que ultrapassam a linha pontilhada divisória (nível de confiança $p = 0,05$) são referentes a parâmetros significativos no modelo que ainda precisam ser ajustados para a obtenção da condição ótima. O número a frente de cada barra representa o valor experimental da distribuição t de Student. Pode-se observar que dentro da faixa escolhida, todas as interações entre fatores são insignificantes. Os fatores isolados, com exceção da massa de sal de TI(I) , não apresentaram significância considerando os níveis escolhidos, indicando, em princípio, que os parâmetros foram robustos dentro das faixas selecionadas.

A análise estatística indicou que a massa de TINO_3 necessitava ainda de ajuste. Assim, a faixa de trabalho para a massa de TINO_3 deveria ser expandida devido ao sinal positivo indicado no gráfico de Pareto. No caso do valor de pH, o estudo indicou que a faixa entre 8,4 e 12,6 está adequada e é robusta.

Tabela 4: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial composto central 2^2 usando TINO_3 como sal indutor de sinal fosforescente para a CPT (111 ng).

Experimento	Replicatas	pH	TINO_3 (μg)	Sinal fosforescente (u.a.)
4	1	12,0	332	59
16	2	12,6	266	43
28	3	10,5	346	67
7	1	10,5	186	32
14	2	12,0	332	62
1	1	9,0	213	37
25	3	8,4	266	34
6	1	12,6	266	40
27	3	10,5	186	38
23	3	12,0	213	41
22	3	9,0	332	54
9 (C)	1	10,5	266	42
21	3	9,0	213	30
3	1	12,0	213	43
5	1	8,4	266	31
11	2	9,0	213	29
24	3	12,0	332	43
13	2	12,0	213	39
2	1	9,0	332	43
30 (C)	3	10,5	266	57
18	2	10,5	346	54
29 (C)	3	10,5	266	41
26	3	12,6	266	38
19 (C)	2	10,5	266	44
15	2	8,4	266	29
12	2	9,0	332	46
8	1	10,5	346	52
17	2	10,5	186	33
20 (C)	2	10,5	266	51
10 (C)	1	10,5	266	43

(C) - ponto central do planejamento.

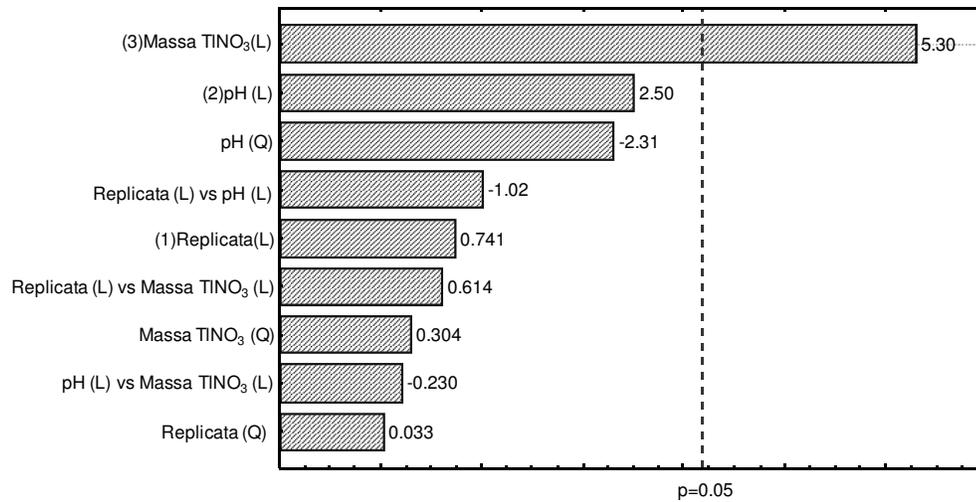


Figura 18: Gráfico de Pareto para fosforescência da CPT (111 ng) induzida por $TiNO_3$.

Na Figura 20 é mostrada a curva de nível que foi gerada a partir do planejamento experimental, onde se podem estimar os valores que apresentaram maior intensidade de fosforescência para a CPT para os dois fatores (10,5 para o pH e 346 μg para a massa de $TiNO_3$). Vale ressaltar que esses valores ótimos foram muito próximos aos obtidos nos estudos univariados.

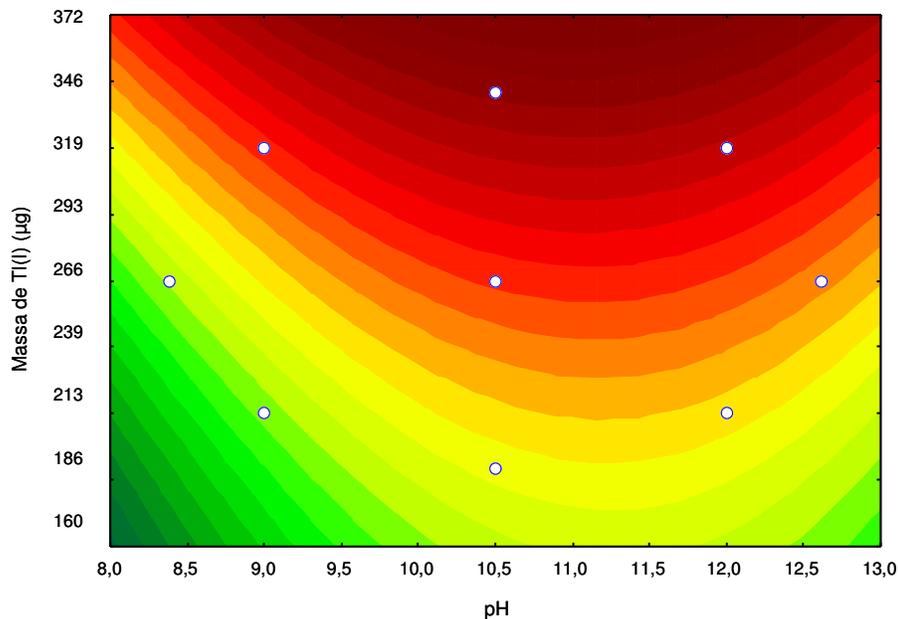


Figura 19: Curva de nível obtida no planejamento fatorial da CPT (111 ng) na presença de $Ti(I)$.

Como a massa de sal de TlNO_3 foi indicada como a única variável a ser ajustada, realizou-se novamente um estudo univariado, expandindo-se a massa do sal a partir de 332 μg . O estudo, dessa vez mais detalhado, foi realizado com as seguintes massas de TlNO_3 : 0, 67, 133, 200, 266, 332, 400, 466, 532 e 664 μg . A Figura 21 mostra a média de três medições com respectivos desvios-padrão para a faixa estudada.

De acordo com os resultados, o sinal da CPT sofre um decaimento após a massa de 332 μg de tálio (fato já evidenciado anteriormente no estudo univariado). Assim, este estudo comprovou que a massa de TlNO_3 na faixa entre 266 e 332 μg foi adequada.

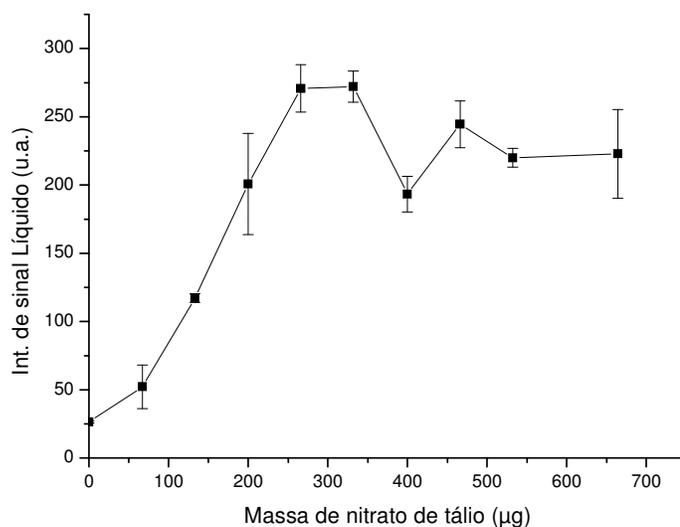


Figura 20: Curva univariada da variação de fosforescência da CPT (111 ng) em função da massa de TlNO_3 depositada no substrato.

3.2.3. Estudos univariados com a CPT-11

Para a CPT-11, a estratégia para otimização de fosforescência foi menos rigorosa, pois o objetivo, nesse caso, foi o de quantificar CPT-11 em amostras nas quais este analito estaria presente como componente principal (formulações farmacêuticas anticâncer). Sendo assim, como a CPT-11 (na forma de cloridrato) é plenamente solúvel em água, este foi o solvente escolhido sem a preocupação de se avaliar a influência da presença de solventes orgânicos no sistema carreador.

Nos estudos preliminares, já se havia identificado que foi obtida fosforescência intensa da CPT-11 em substratos contendo SDS (360 μg) e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ como sal indutor de fosforescência. O pH da solução carreadora de CPT-11 se mostrou um fator irrelevante, pois a fosforescência desse analito foi praticamente constante na faixa entre pH 5 e 12.

A massa de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no substrato de papel contendo SDS (360 μg) foi estudada variando-se a quantidade do sal de átomo pesado entre 0 e 822 μg . O resultado (Figura 22) indicou uma condição robusta (sinal constante) em substratos contendo entre 563 e 729 μg de $\text{Pb}(\text{II})$. A massa de 662 μg de $\text{Pb}(\text{II})$ foi escolhida para continuidade dos estudos.

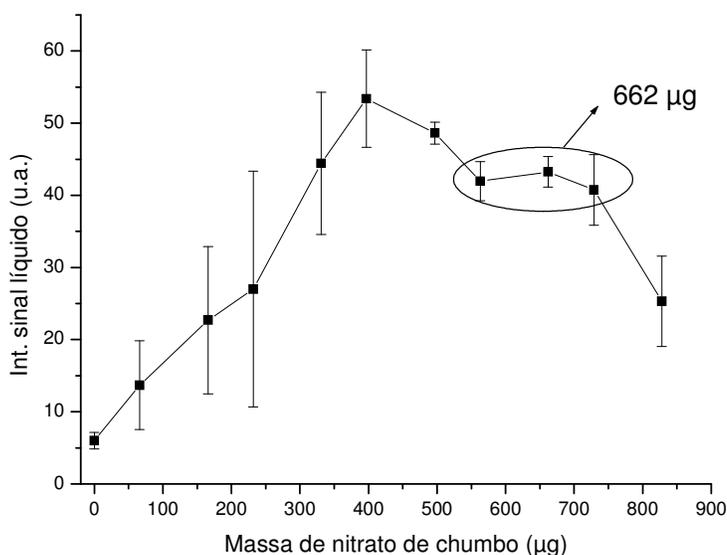


Figura 21: Estudo do efeito da massa de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ presente no substrato de celulose contendo SDS (360 μg) na fosforescência da CPT-11(135 ng).

A influência da quantidade do SDS (no centro do substrato) na fosforescência da CPT-11 foi estudada em substratos contendo sal de $\text{Pb}(\text{II})$. No papel foram aplicados 5 μL de soluções de SDS, de modo a se ter diferentes massas, do surfactante, variando de 0 a 721 μg . De acordo com o resultado obtido (Figura 23), a quantidade de SDS no substrato afeta significativamente o sinal da CPT-11, sendo a massa de modificador escolhido para continuidade do trabalho de 577 μg , devido à intensidade de sinal obtida e a pouca variabilidade do mesmo na faixa entre 500 e 600 μg .

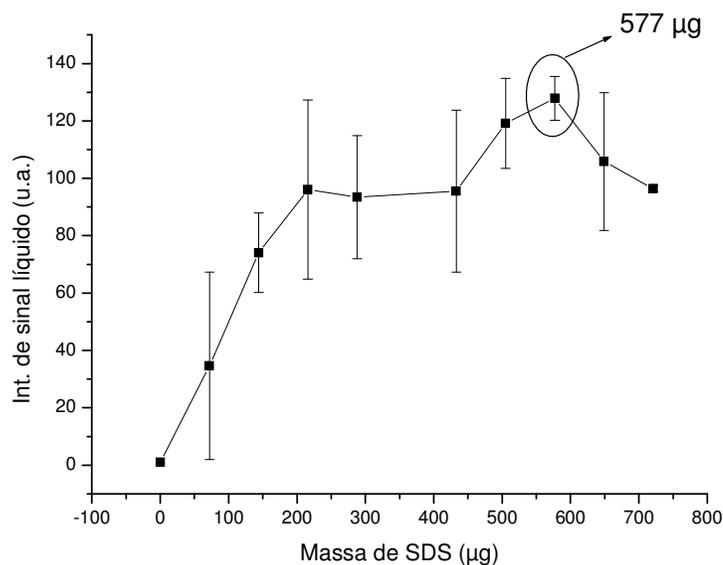


Figura 22: Estudo do efeito do SDS presente no substrato de celulose na fosforescência do CPT-11 (135 ng) na presença do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (662 µg).

3.2.4. Otimização de parâmetros instrumentais

3.2.4.1. Tempo de atraso - Delay

As moléculas no estado excitado têm um tempo de vida finito, tendendo a retornar ao estado eletrônico fundamental com a liberação de energia. No caso da fosforescência, o tempo no qual a população de moléculas permanece no estado excitado é da ordem de microsegundos até alguns segundos, tempo esse necessário para que a população absorva a energia de excitação, atinja S_1 , sofra cruzamento intersistemas (CIS) para alcançar T_1 e, finalmente, retorne para o estado fundamental emitindo radiação. O efeito externo do átomo pesado, que amplifica a fosforescência, tende a diminuir o tempo de vida desse processo, sendo isso efetivamente um dos fatores que fazem com que a fosforescência se torne mais eficiente em relação aos processos não-radiativos de desativação do estado excitado. Deste modo, um tempo de atraso na abertura do detector (delay time) pode ser ajustado para adquirir o sinal fosforescente após um tempo

crítico, no qual processos rápidos como espalhamento de radiação e fluorescência de substâncias concomitantes e do próprio substrato já tenham cessado. A escolha desse tempo crítico depende da natureza da substância a ser determinada e das condições do meio (substrato, AP, etc). Logo, se torna relevante um teste do tempo de abertura do detector em relação ao sinal do analito, levando em consideração também o sinal de fundo. Este estudo foi realizado na faixa de tempo de atraso entre 0,05 e 3 μ s, com a banda espectral de passagem de 10 nm.

O estudo com a CPT (696 ng) foi realizado em substrato contendo 332 μ g de sal de TI(I) e com a CPT-11 (135 ng) na presença de 577 μ g de SDS e 662 μ g do sal de Pb(II). Analisando a Figura 24 e a Figura 25, pode-se observar que, em ambos os casos, a maior intensidade do sinal fosforescente foi com aplicação de tempo de atraso de 0,05. No entanto, 0,10 μ s foi escolhido para garantir a menor contribuição possível do sinal de fundo do substrato.

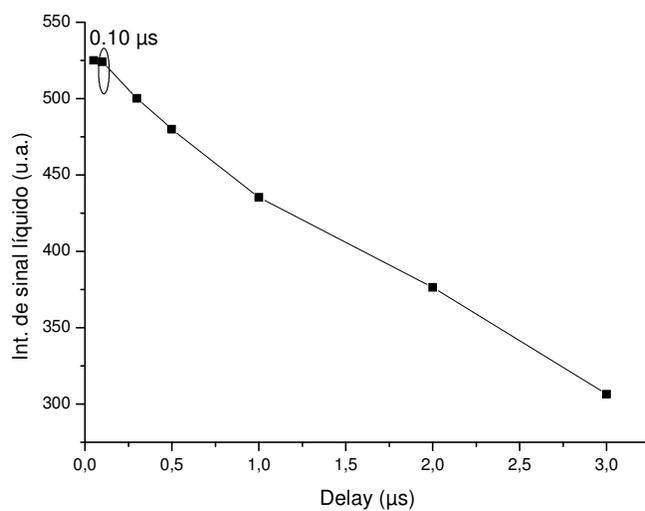


Figura 23: Influência do tempo de atraso de detecção na fosforescência da CPT (696 ng) em substrato de papel contendo 332 μ g de $TiNO_3$.

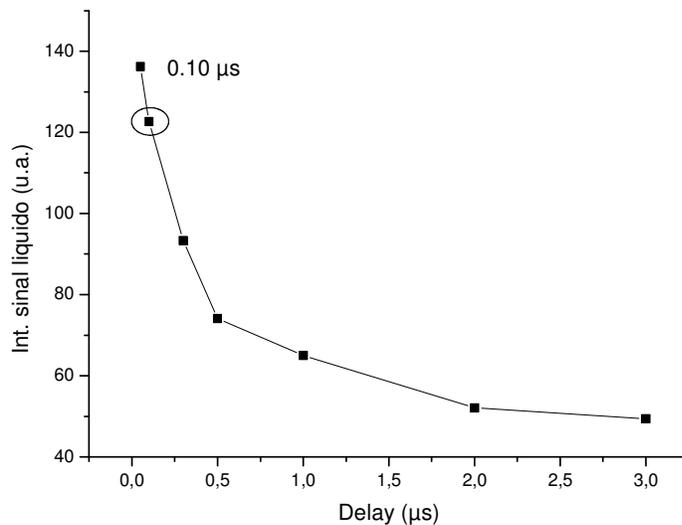


Figura 24: Influência do tempo de atraso de detecção na fosforescência da CPT-11 (101 ng) em substrato de papel contendo 577 μg de SDS e 662 μg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

3.2.4.2. Banda espectral de passagem

A banda espectral de passagem, controlada pelo tamanho das fendas do instrumento, limita a quantidade de radiação que incide na amostra e também a que chega ao monocromador de emissão. Logo, a influência desse parâmetro se torna relevante, pois, antes da saturação da transição, a luminescência medida é diretamente proporcional à intensidade da radiação de excitação. A banda espectral de passagem também influencia na largura dos espectros obtidos e pode ser usada, em casos mais específicos, no controle da influência de sinal de espécies concomitantes no sinal do analito.

Os valores da banda espectral de passagem foram variados entre 10 e 20 nm, com valor de tempo de atraso do detector fixado em 0,10 μs. Observou-se, que tanto para a CPT quanto para a CPT-11 a maior intensidade de sinal foi adquirida com a maior abertura da banda espectral (20 nm), o que já era esperado, conforme pode ser observado na Figura 26 e na Figura 27.

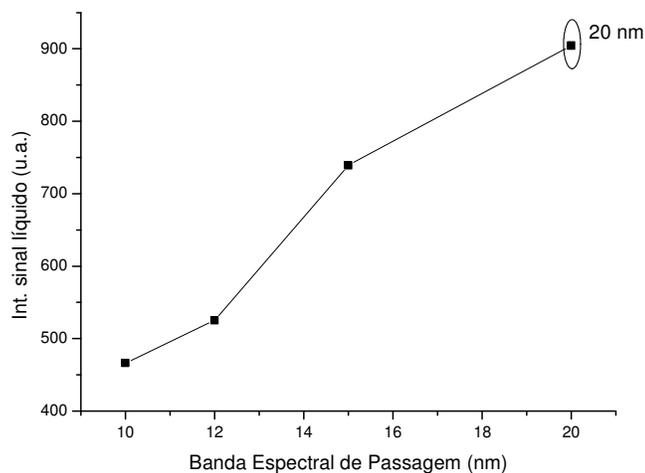


Figura 25: Estudo da influência da banda espectral de passagem de emissão na fosforescência da CPT (696 ng) em substrato de celulose contendo 332 μg de TINO_3 .

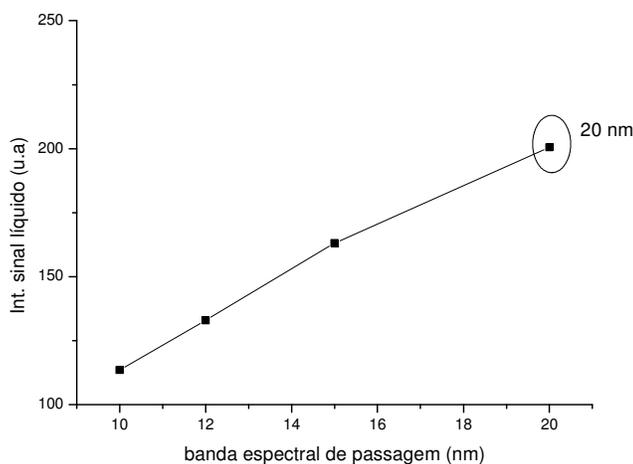


Figura 26: Estudo da influência da banda espectral de passagem de emissão na fosforescência da CPT-11 (101 ng) em substrato de celulose contendo 577 μg de SDS e 662 μg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

3.2.5. Condições experimentais e instrumentais otimizadas

Na Tabela 5 estão resumidas as condições experimentais e instrumentais para a determinação de CPT e de CPT-11. Na Figura 28 e na Figura 29 são mostrados os espectros de fosforescência de CPT e de CPT-11, observados antes da otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais e após o

processo de otimização. No caso da CPT obteve-se uma amplificação de 8 vezes na intensidade do sinal fosforescente (Figura 28), enquanto que na CPT-11 o aumento foi de 2,3 vezes (Figura 29). Os sinais de fundo do substrato de celulose também são indicados.

Tabela 5: Condições experimentais e instrumentais escolhidas para determinação fosforimétrica da CPT e CPT-11.

Parâmetros Otimizados	CPT Condições escolhidas ^c	CPT-11 Condições escolhidas ^d
Átomo pesado	Tl(I)	Pb(II)
Massa de átomo pesado (μg)	332	662
Massa de SDS (μg)	- ^a	577
pH	10,5	- ^b
Sistema de solventes	100% Metanol	100% Água ultrapurificada
Velocidade de varredura (nm min^{-1})	1500	1500
$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	370/570	370/540
Tempo de abertura (gate time) do detector (μs)	3	3
Tempo de atraso (Delay time) do detector (μs)	0,10	0,10
Banda espectral de passagem de emissão (nm)	20	20

^a Parâmetro não utilizado

^b Parâmetro não avaliado

^c validade dos parâmetros na faixa de 41,8 a 348,0 ng

^d validade dos parâmetros na faixa de 101,5 a 440,2 ng

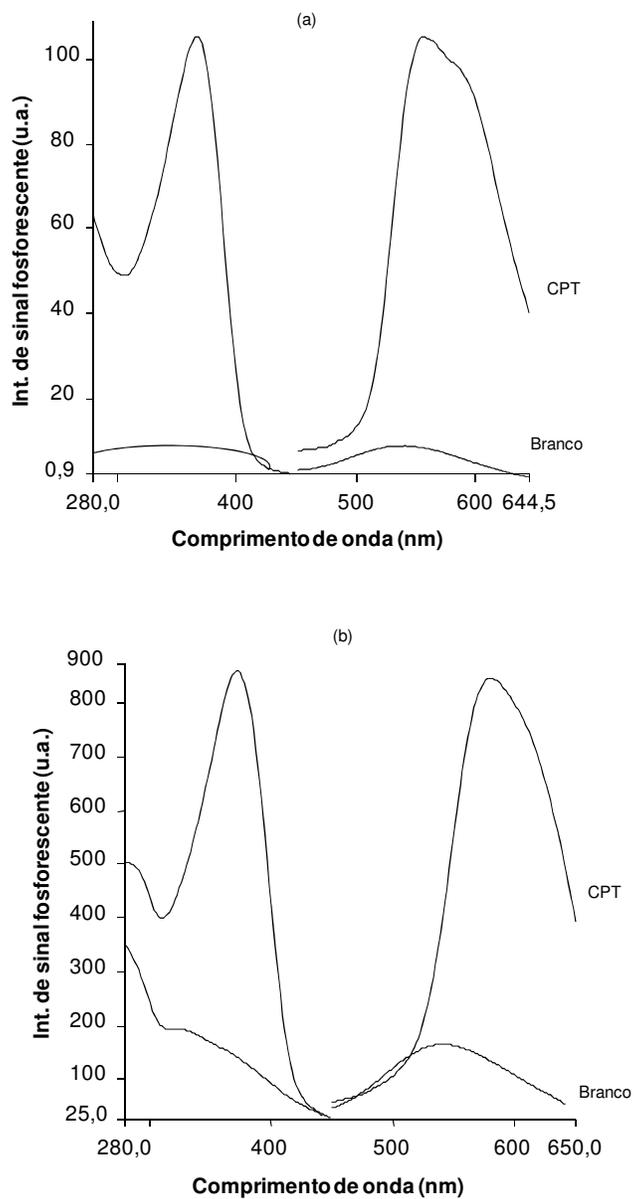


Figura 27: Espectro de fosforescência da CPT (348 ng) (a) antes da otimização e (b) depois da otimização experimental e instrumental.

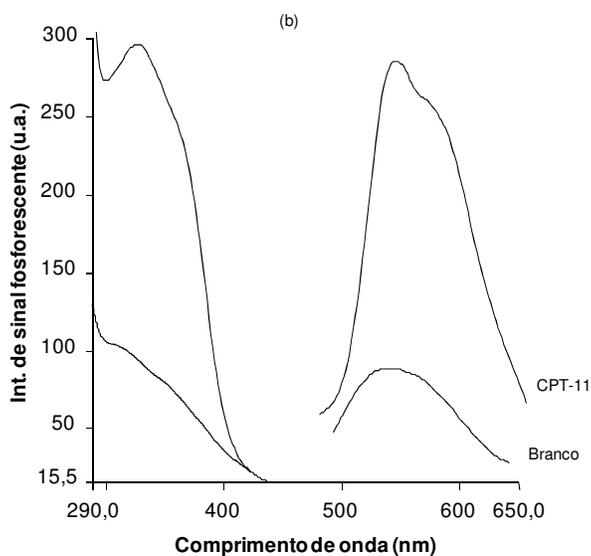
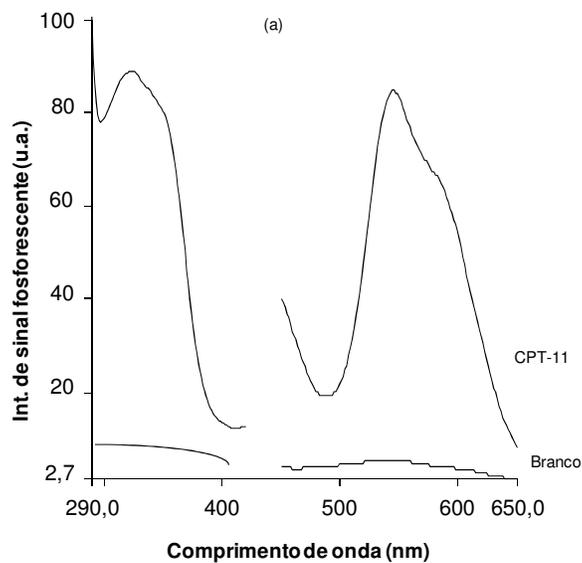


Figura 28: Espectro de fosforescência da CPT-11 (135 ng) (a) antes da otimização e (b) depois da otimização experimental e instrumental.

3.3.Comparação entre diferentes substratos (nylon e celulose)

Como a CPT pode ser encontrada como contaminante de formulações farmacêuticas, é de extrema importância garantir a melhor sensibilidade para o método analítico e resultados confiáveis com incerteza conhecida e de preferência, baixa. Essas características dependem em parte da magnitude e da

variabilidade do sinal de fundo medido. Assim sendo, neste trabalho foi realizado um estudo comparativo entre os substratos de celulose e de nylon. Trabalhos realizados^{59,61} com nylon apontaram uma melhoria na detectabilidade de espécies químicas por SSRTP, quando comparados com os resultados obtidos em substrato de celulose. Adicionalmente, o nylon produz um sinal de fundo baixo, uniforme e estável ao contrário do observado no papel de celulose (mesmo no papel tratado para redução de sinal de fundo). O sinal de fundo baixo observado com o nylon ocorre mesmo na presença de TI(I), AP que costuma produzir um aumento considerável da fosforescência de fundo da celulose. Vantagens extras podem ser mencionadas, como por exemplo, o nylon não requer tempo de secagem muito elevado como o necessário para o substrato de celulose (2 h). Os estudos dessa dissertação indicaram um tempo de secagem de 40 min, (sob vácuo) após a adição de amostra e coadjuvantes, para a obtenção de sinal máximo e de pouca variabilidade. Além disso, o nylon não requer tratamento prévio para a redução do sinal de fundo, enquanto no substrato de celulose são gastos aproximadamente 5 h para se atingir a redução de 98% de seu sinal de fundo original, como mencionado no Capítulo 2.

O estudo levou em consideração as mesmas condições (pH da solução carreadora e massa de AP) otimizados para a observação de fosforescência máxima da CPT em substrato de celulose. Evidentemente, deve-se deixar claro que devido à natureza do processo de indução de fosforescência em superfície sólida (dependente da interação substrato-analito-AP) a mudança do tipo de substrato pode acarretar na ação de diferentes mecanismos de interação com analito, implicando em variações nas condições para máximo sinal analítico. Os espectros comparados (Figura 30) indicam a amplificação da fosforescência da CPT em torno de duas vezes quando se utiliza o substrato de nylon. Adicionalmente, os espectros comparados dos ensaios em branco (Figura 31) indicaram uma redução de 2 vezes no sinal de fundo medido a (370/570 nm). O impacto da redução da variabilidade do sinal de fundo na detectabilidade da CPT será descrito em detalhes adiante. Os resultados obtidos nesses estudos indicaram o nylon um substrato promissor para determinação de CPT por SSRTP.

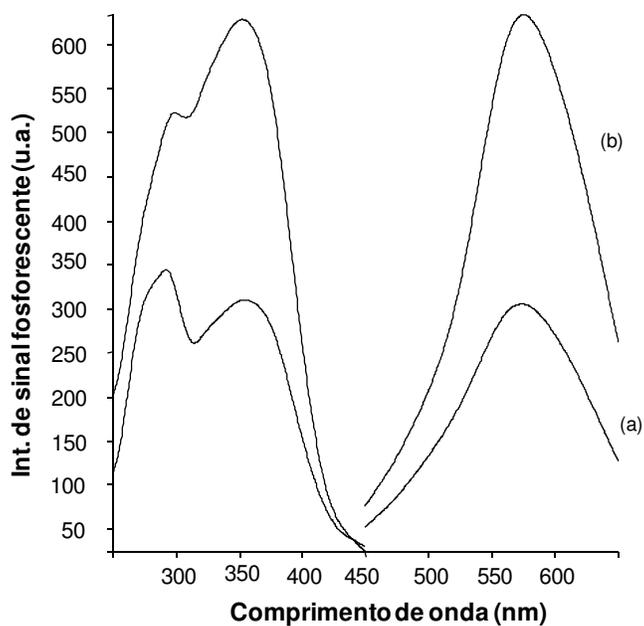


Figura 29: Espectros de fosforescência da CPT (69 ng) em diferentes substratos (a) celulose (b) nylon (sal de AP: 332 μg de TINO_3).

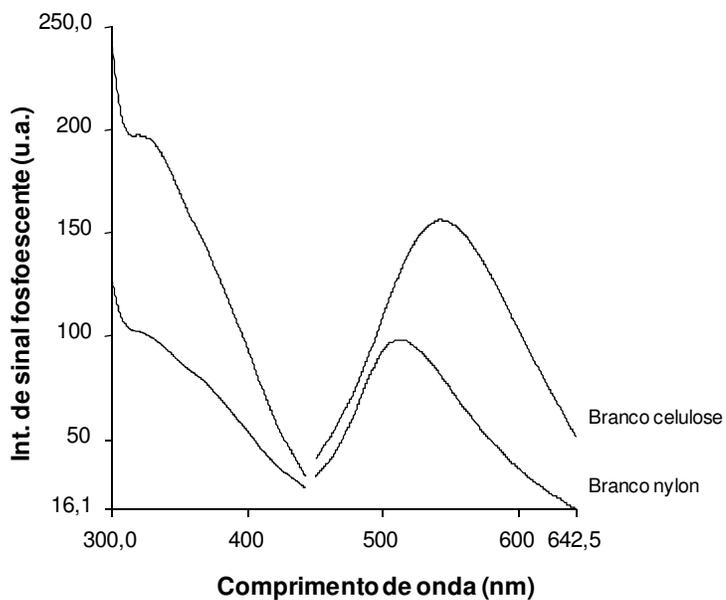


Figura 30: Espectros dos ensaios em branco do substrato de celulose e nylon