

4 Resultados e discussão – estudos de seletividade e validação

4.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de avaliar de forma inequívoca os analitos de interesse na presença de componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Essa característica, extremamente desejável nos métodos analíticos, permite a discriminação de sinais do analito na presença de seus metabólitos, derivados ou de concomitantes de estrutura muito semelhantes, de modo a analisar o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método.

4.1.1. Avaliação da interferência dos alcalóides

Como se pretende determinar potenciais contaminações de CPT em matrizes contendo CPT-11 e TPT (medicamentos anticâncer), um estudo detalhado para verificar a possibilidade da determinação seletiva da CPT foi realizado. Assim, misturas sintéticas contendo CPT e TPT ou CPT-11 foram preparadas, de modo a ter um conjunto de soluções cujas proporções CPT: interferente (no caso CPT-11 ou TPT) variassem de 1:1 a 1:40 v/v.

Primeiramente, os sinais analíticos foram medidos em 570 nm (máximo de excitação nas condições para a CPT) e os sinais obtidos das misturas comparados com os sinais analíticos obtidos a partir da medição de uma solução padrão de CPT (4×10^{-4} mol L⁻¹) cuja concentração foi equivalente à concentração de CPT encontrado nas misturas sintéticas. Dessa comparação, os resultados foram apresentados na forma das razões $I_{CPT}/I_{CPT/TPT}$ e $I_{CPT}/I_{CPT/CPT-11}$ que são as razões entre as fosforescências medidas da solução padrão de CPT e a medida da mistura sintética. Razões com valores próximos da unidade indicam ausência de interferência da CPT-11 ou TPT no sinal da CPT. Valores menores que 1 indicam interferência espectral no sinal da CPT. Já os valores maiores que 1 indicam diminuição do sinal da CPT na mistura.

Na Tabela 6, as razões $I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/CPT-11}}$ e $I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/TPT}}$ mostraram que ao se realizar as medições de CPT em 570 nm, a CPT-11 não interferiu no sinal da CPT em soluções contendo concentrações até cinco vezes maiores de CPT-11 (Figura 32). Para soluções com maior quantidade relativa de CPT-11, interferência espectral foi observada ($I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/CPT-11}} < 1$). No caso da TPT, a interferência espectral imposta foi ainda mais severa, isto é, a razão $I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/TPT}}$ é igual a 1 apenas para misturas equimolares de CPT e TPT.

Tabela 6: Avaliação da interferência do CPT-11 e do TPT na fosforescência do CPT com medições a 570 nm do espectro de emissão obtido por varredura normal.

CPT / CPT-11 ou CPT / TPT	ou (mol L ⁻¹)	Proporção	$I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT-11}}$ ^a	$I_{\text{CPT}}/I_{\text{TPT}}$ ^b
$4 \times 10^{-5} / 4 \times 10^{-5}$		1:1	1.07	1.03
$4 \times 10^{-5} / 2 \times 10^{-4}$		1:5	0.96	0.80
$4 \times 10^{-5} / 4 \times 10^{-4}$		1:10	0.71	0.61
$4 \times 10^{-5} / 6 \times 10^{-4}$		1:15	- ^c	0.61
$4 \times 10^{-5} / 1 \times 10^{-3}$		1:25	- ^c	0.59
$4 \times 10^{-5} / 1,6 \times 10^{-3}$		1:40	- ^c	0.56

^a $I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/CPT-11}}$ – valor da razão da intensidade de sinal fosforescente da solução de CPT sobre a mistura contendo CPT + CPT-11 obtidos por varredura normal.

^b $I_{\text{CPT}}/I_{\text{CPT/TPT}}$ – valor da razão da intensidade de sinal fosforescente da solução de CPT sobre a mistura contendo CPT + TPT obtidos por varredura normal.

^c Não foram medidas as intensidades de sinal fosforescente nessas proporções para a CPT-11.

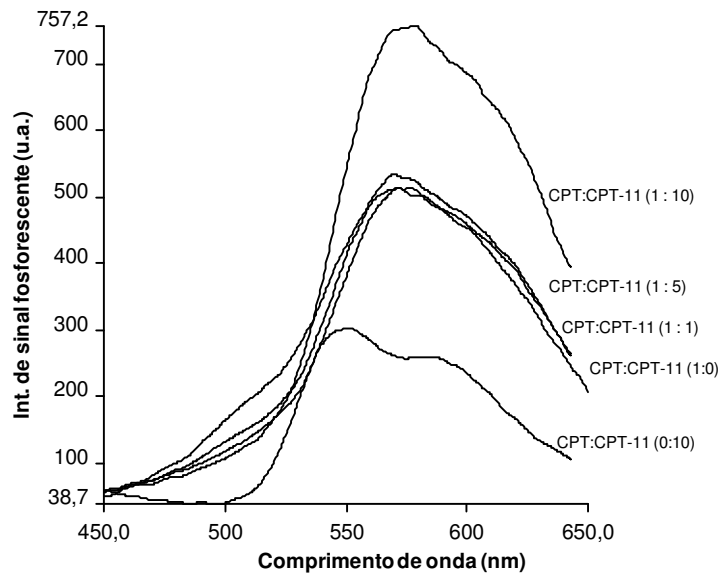


Figura 31: Estudo de interferência da CPT-11 no sinal fosforescente da CPT.

Uma das maneiras de se minimizar as interferências espectrais é por meio de uso de tratamento dos dados espectrais. No caso desse trabalho, utilizou-se a derivação espectral de ordem superior, como mencionado no Capítulo 1.

No caso da CPT-11, a derivação de ordem superior não promoveu nenhuma melhoria na resolução entre os espectros da CPT e da CPT-11, pois a superposição entre a CPT-11 e a CPT é praticamente total (como pode ser visto na Figura 14 do capítulo anterior). Para a TPT, os resultados são indicados na Tabela 7. Nesse caso, as razões $I_{CPT}/I_{CPT/TPT}$ indicaram que a resolução espectral promovida pela derivada de 2ª ordem permitiu a determinação seletiva de CPT em amostras contendo até 40 vezes mais TPT. O sucesso dessa abordagem se deve a escolha do λ_{iso} , onde a contribuição do sinal da TPT foi nula em 367 nm do espectro de excitação (como mostrado na Figura 33), e o ruído do papel é praticamente nulo (Figura 34). Outro ponto isodiferencial em 295 nm poderia ser usado, no entanto, é nessa região espectral que o sinal de fundo do papel foi mais proeminente.

Tabela 7: Estudo de interferência da fosforescência da CPT em misturas contendo CPT/TPT.

CPT / TPT (mol L ⁻¹)	Proporção	I _{CPT} /I _{TPT} ^a
3,0 x 10 ⁻⁵ / 3,0 x 10 ⁻⁵	1:1	1,04
3,0 x 10 ⁻⁵ / 1,5 x 10 ⁻⁴	1:5	1,04
3,0 x 10 ⁻⁵ / 3,0 x 10 ⁻⁴	1:10	1,02
3,0 x 10 ⁻⁵ / 4,5 x 10 ⁻⁴	1:15	1,05
3,0 x 10 ⁻⁵ / 7,5 x 10 ⁻⁴	1:25	0,98
3,0 x 10 ⁻⁵ / 1,2 x 10 ⁻³	1:40	1,02

^a I_{CPT}/I_{TPT} – valor da razão da intensidade de sinal fosforescente da solução de CPT sobre a mistura contendo CPT + TPT.

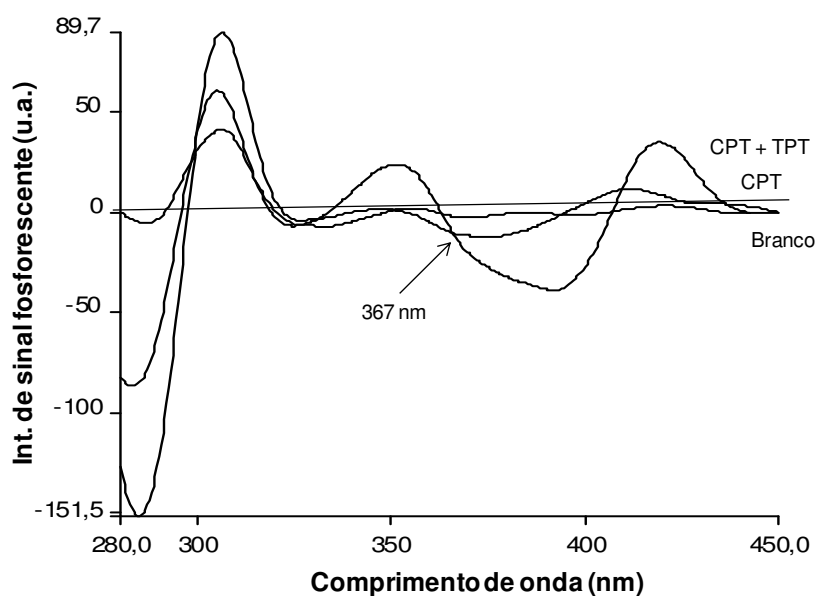


Figura 32: Espectros da derivada de 2ª ordem da CPT em soluções contendo concentrações de TPT 40 vezes maior.

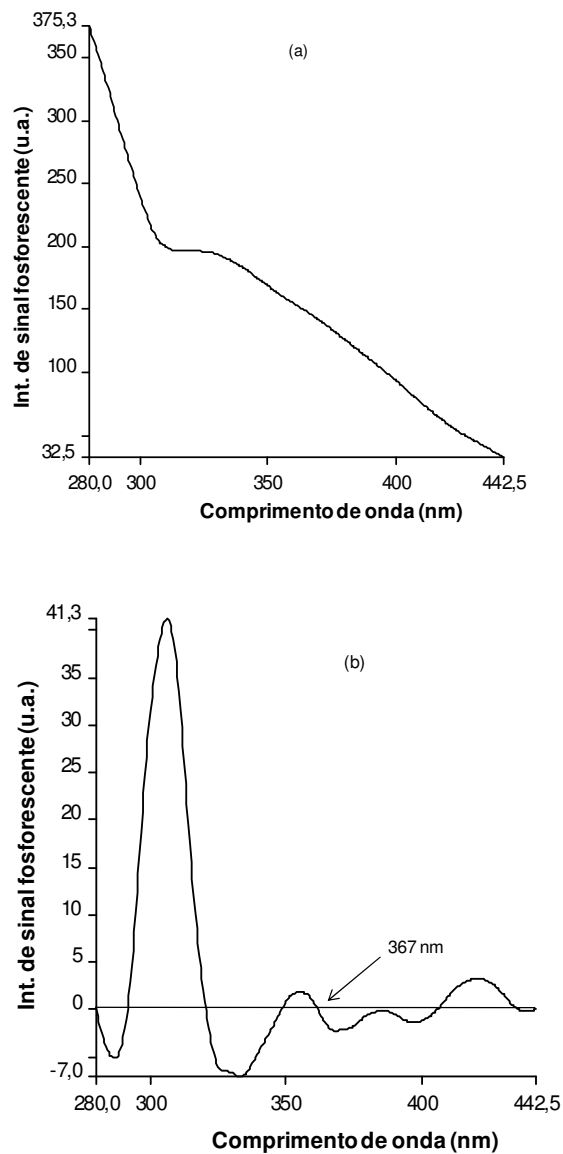


Figura 33: Brancos da excitação (a) antes e (b) depois da derivação.

4.1.2. Avaliação da interferência de fluidos biológicos na fosforescência da CPT

Para avaliar o efeito das matrizes da urina e da saliva no sinal analítico da CPT alíquotas da solução de CPT foram transferidas para balões volumétricos contendo solução tampão Britton-Robinson em pH 10,5, (50%v/v) ajustando o volume final com urina ou saliva. Para urina, fez necessária a limpeza prévia da amostra por meio de procedimento para separação das proteínas conforme descrito no Capítulo 2. A concentração de CPT nas soluções da amostra foi $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O sinal obtido foi comparado ao de uma solução

padrão de CPT de concentração equivalente ao das amostras contendo fluido biológico. As soluções e ensaios em branco de saliva e urina (fluidos não fortificados com CPT) também foram depositados nos substratos de celulose para se avaliar o sinal característico das matrizes. Os espectros das matrizes urina e saliva, juntamente com os espectros característicos do papel (ensaio em branco) são indicados na Figura 35 e na Figura 36. Embora na urina tenha ocorrido um pequeno efeito de matriz reduzindo o sinal da CPT e do ensaio em branco, os resultados indicaram que as matrizes urina e saliva não interferem na fosforescência da CPT (pois os valores de sinais líquidos, $I_{CPT} - I_{Branco}$ e $I_{CPTurina} - I_{urina}$ são iguais), viabilizando a determinação do contaminante em fluidos biológicos.

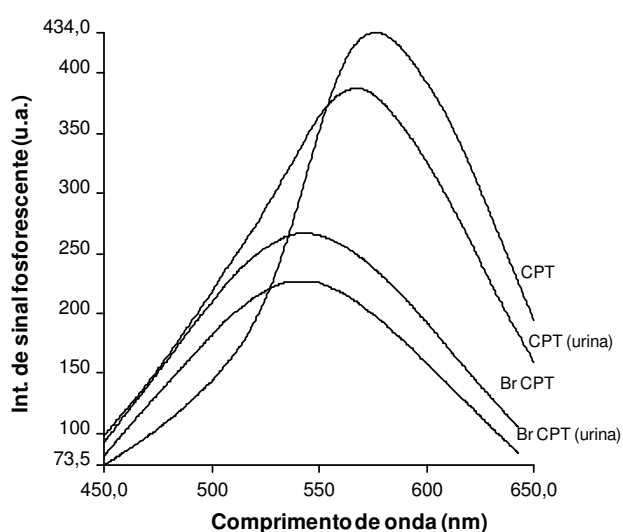


Figura 34: Espectros de emissão da recuperação da CPT ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em urina.

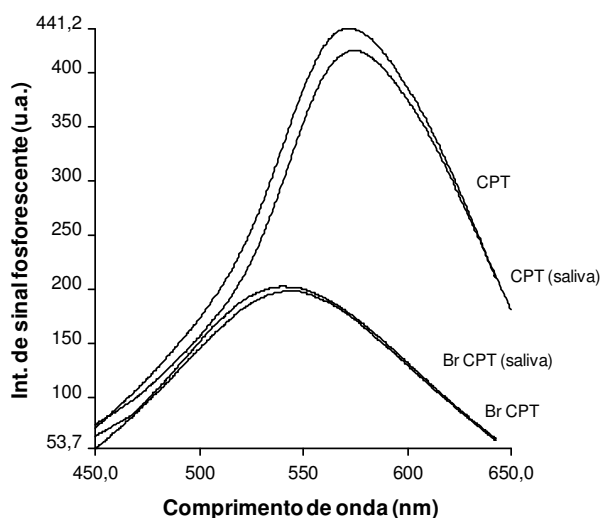


Figura 35: Espectros de emissão da recuperação da CPT ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em saliva.

O estudo com fluidos biológicos foi meramente especulativo, a fim de mostrar o potencial da SS RTP em fluidos. No caso da CPT-11, não houve preocupação em realizar estudos em fluidos biológicos, porque a matriz de interesse para este princípio ativo era medicamentos.

4.2. Validação dos métodos

A escolha da metodologia analítica é etapa crítica para o controle de qualidade de uma formulação farmacêutica. A fim de garantir a geração de informações confiáveis sobre as amostras, o método analítico deve passar pelo processo de validação.

A validação de métodos analíticos desenvolvidos no laboratório é a etapa efetuada após a seleção da técnica, escolha e otimização das condições experimentais para os métodos⁷⁵. Segundo a ABNT, a validação do método analítico é a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos^{75,76}. A orientação sobre validação de métodos analíticos elaborado pelo INMETRO⁷⁷ recomenda que, se for aplicável, sejam investigadas as seguintes características de desempenho: faixa de resposta linear, capacidade de detecção (limite de detecção, LD e quantificação, LQ), robustez, precisão, (repetitividade e reprodutibilidade) e tendência ou recuperação (%). Utilizando as condições escolhidas para a CPT e a CPT-11, foram definidos alguns parâmetros de validação, que serão apresentados a seguir. No caso da CPT, o método foi validado em substrato de celulose e de nylon, com a finalidade de se realizar uma posterior comparação do desempenho com os dois diferentes substratos.

4.2.1. Faixa de resposta linear

A faixa de resposta linear de um método é avaliada por meio do coeficiente de correlação linear (r) e de determinação (R^2). Entretanto, também é necessário avaliar a homogeneidade das variáveis, que pode ser checada por meio de alguns testes estatísticos, como por exemplo, o teste t de Student, a prova F de Fischer, o intervalo de confiança do coeficiente angular e pelo coeficiente de determinação. Os parâmetros da curva podem ser obtidos pela

regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados (quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados - homoscedasticidade).

A faixa de resposta linear dos métodos foi então avaliada por meio da construção de curvas analíticas onde foram obtidos parâmetros como os coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2).

Para a CPT e para a CPT-11 foram construídas três curvas analíticas usando as condições otimizadas em substrato de celulose. No caso da CPT, duas abordagens diferentes foram usadas na medição de sinal: (i) usando medição em 570 nm do espectro de emissão obtido por varredura normal e (ii) usando medição em 367 nm que é o ponto isodiferencial do espectro de excitação derivado (2^a ordem). Curvas de CPT em dois substratos diferentes (celulose e nylon) também foram realizadas. Na Tabela 8, observam-se os parâmetros analíticos de uma curva representativa para cada situação.

Tabela 8: Parâmetros analíticos para a CPT, CPT usando varredura de 2^a ordem, CPT depositada no substrato de nylon e para a CPT-11.

Parâmetros	CPT	CPT-derivada	CPT-nylon	CPT-11
Coefficiente angular	$3,86 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$1,15 \times 10^7$	$7,15 \times 10^6$
Coefficiente Linear	-26.59	-1.16	11.47	-59.57
R	0.9924	0.9981	0.9992	0.9959
R^2	0.9850	0.9961	0.9984	0.9917
R^2 ajustado	0.9812	0.9948	0.9979	0.9897
F_{cal}	262 ^a	772 ^b	1873 ^b	480 ^a

^aValor crítico de F igual a 6,61 (GL = 5)

^bValor crítico de F igual a 7,71 (GL = 4)

A faixa de resposta linear obtida se estendeu entre o intervalo de massa da CPT de 41,8 ng (5 μ L de solução $2,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e 348 ng (5 μ L de solução 2×10^{-4} mol L⁻¹). Essa faixa foi limitada pela solubilidade máxima da CPT no sistema de solventes.

Na figura 37 é ilustrada uma curva analítica típica para a CPT usando a varredura normal (a) e a varredura da derivada de 2^a ordem (b) onde cada ponto da curva é representado pela média de três medições de sinal e os pontos acima e abaixo da média o desvio padrão da medição. Na sequência, o gráfico de resíduos (Figura 38) indica comportamento homocedático, confirmando que o

método de regressão linear simples por método dos mínimos quadrados é adequado para a avaliação dos parâmetros desse modelo.

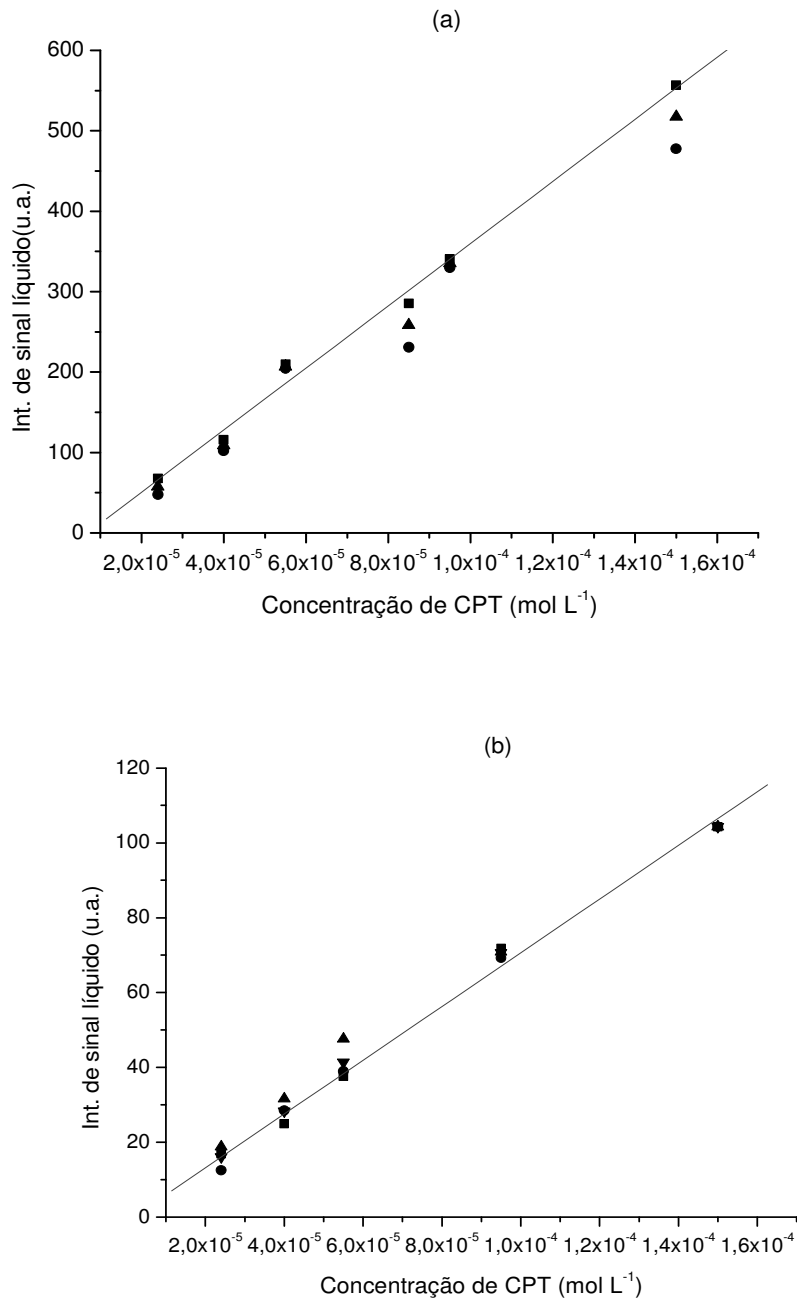


Figura 36: Curvas analíticas da CPT (a) varredura normal e (b) varredura derivada de 2ª ordem.

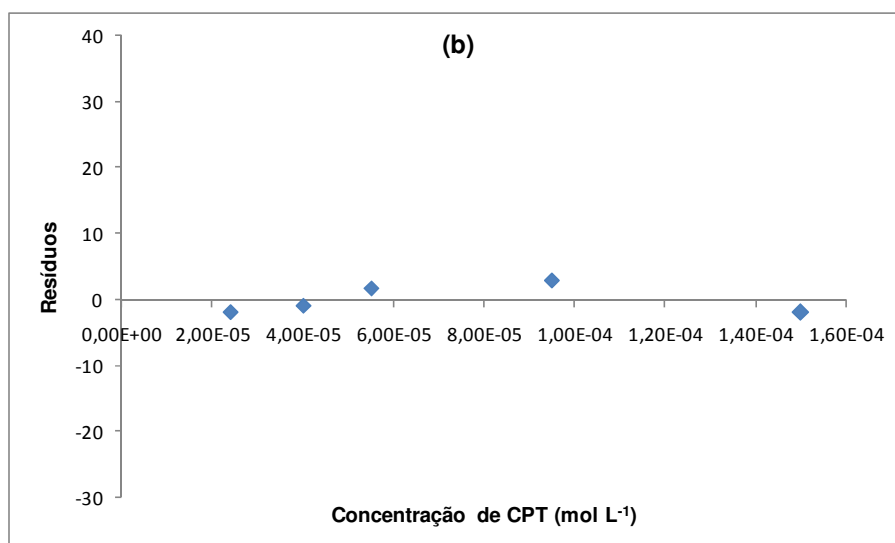
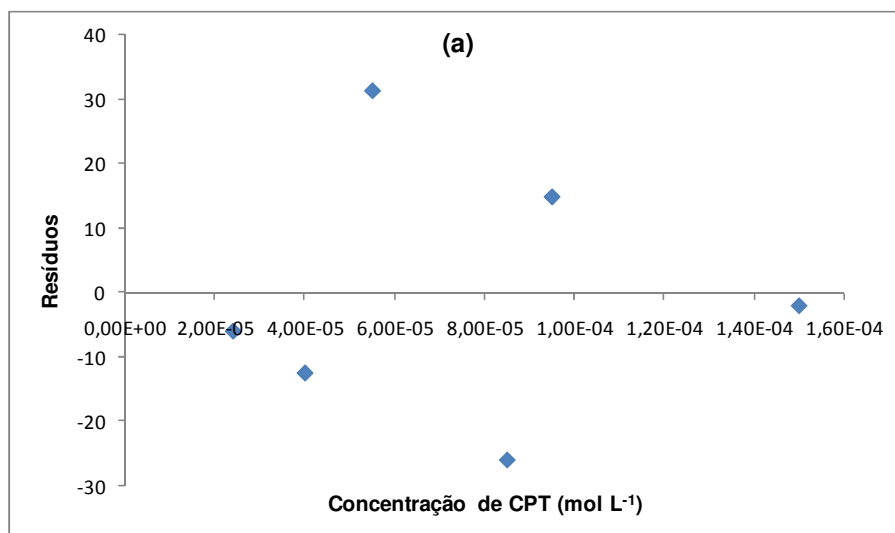


Figura 37: Gráficos de resíduos da CPT (a) varredura normal e (b) varredura derivada de 2^a ordem.

O mesmo estudo foi realizado para a CPT depositada no substrato de nylon, onde a faixa de resposta linear obtida ficou entre 15,6 ng (5 µL de solução 9×10^{-6} mol L⁻¹) e 104,5 ng (5 µL de solução 6×10^{-5} mol L⁻¹), de massa do analito. Na figura 39 é ilustrada uma curva analítica típica para a CPT em nylon. O gráfico de resíduos é mostrado na Figura 40 confirmando o comportamento homocedástico dos resultados.

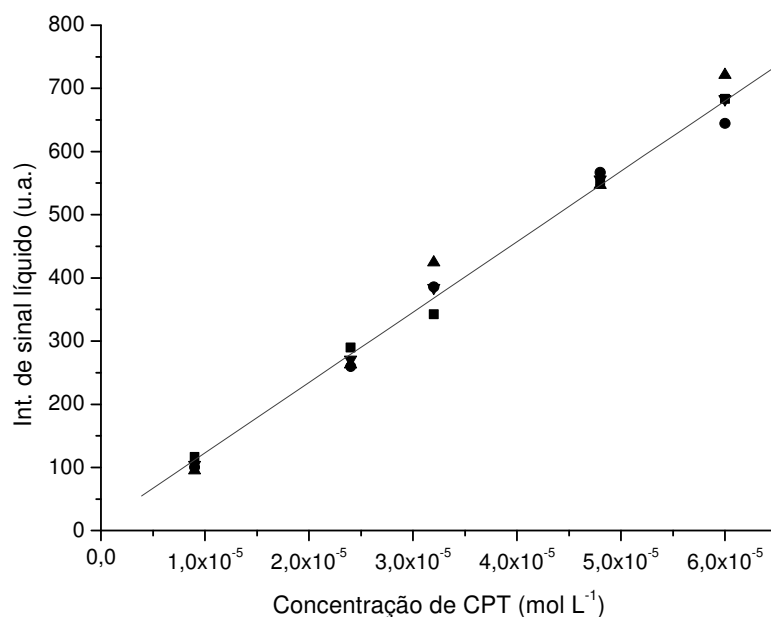


Figura 38: Curva analítica da CPT depositada no substrato de nylon.

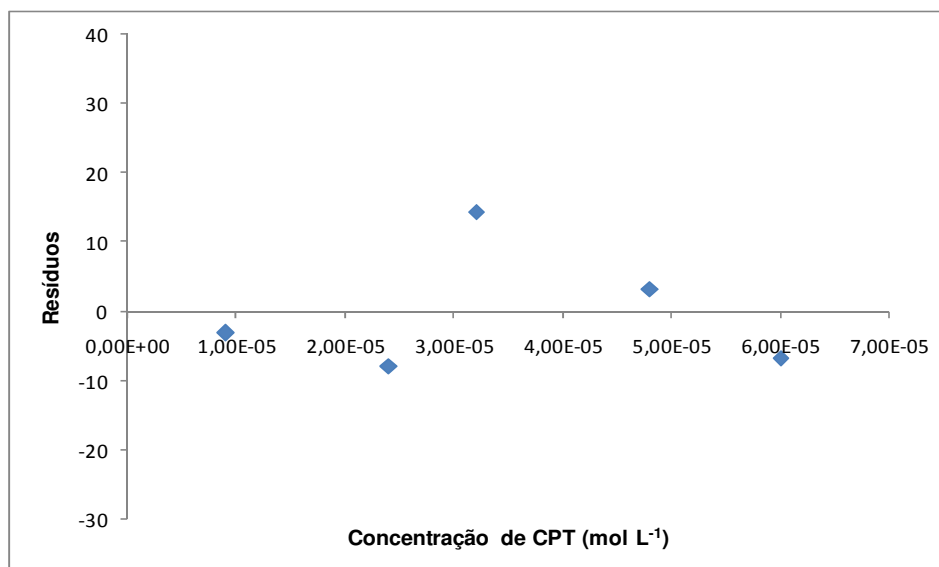


Figura 39: Gráfico de resíduo da CPT depositada no substrato de nylon.

No caso da CPT-11 a faixa linear se estendeu entre o intervalo de massa de 101,5 ng (5 μ L de solução 3×10^{-5} mol L⁻¹) e 440,2 ng (5 μ L de solução $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Na Figura 41 é apresentada uma curva analítica para a CPT-11 no substrato de celulose, onde cada ponto da curva representa a média de três

medições do sinal fosforescente na condição otimizada. A seguir é apresentado o gráfico de resíduos (Figura 42).

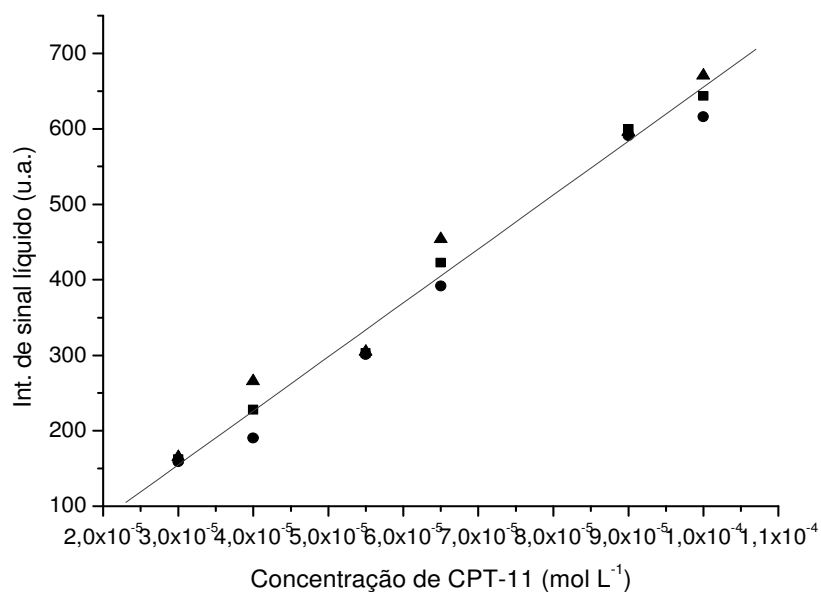


Figura 40: Curva analítica da CPT-11 em substrato de celulose.

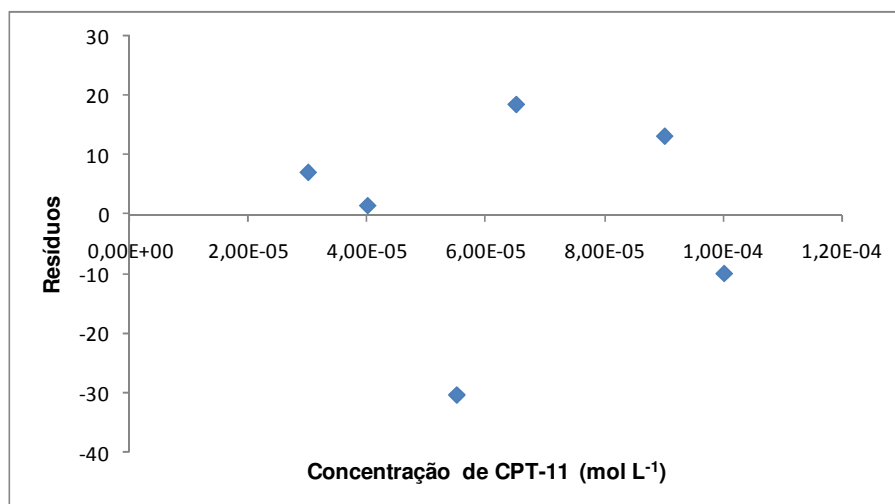


Figura 41: Gráfico de resíduo da CPT-11.

Em todos os casos, o comportamento linear foi indicado pelos valores de coeficientes de correlação (r), de determinação (R^2) e pelo coeficiente de

determinação ajustado (R^2_{adj}), superiores a 98% (Tabela 8). O desvio padrão dos coeficientes angulares encontrados foram inferiores a 4% indicando uma boa precisão das medições. Os gráficos de resíduos em todos os casos confirmaram o comportamento homocedástico dos resultados.

Outra maneira de se avaliar a adequação do modelo linear é por meio do teste F de *Snedecor–Fisher*. Este teste é baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) é dividida pela média quadrática do resíduo (MQ_{res}), para seus respectivos graus de liberdade. Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{calc.} > F_{critico}$) indica a não existência de relação linear, ou seja, se aceita a equação da regressão linear. Conforme os resultados encontrados (Tabela 8), diz-se que o modelo linear é estatisticamente válido, o que confirma o resultado obtido no teste anterior.

4.2.2. Detectabilidade

A capacidade de detecção foi avaliada por meio do cálculo dos limites de detecção (LD) e dos limites de quantificação (LQ) para indicar, respectivamente, a capacidade de medição de sinais que estatisticamente seriam do analito e a capacidade de estabelecer ao analito um valor específico associado a uma incerteza.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base na metodologia apresentada no documento do INMETRO⁷⁷, $LD = 3s_b / a$ e $LQ = 10s_b / a$, onde “ s_b ” é o desvio padrão do branco e “ a ” é o valor do coeficiente angular da curva. Na fosforimetria é muito comum expressar o LD e o LQ em termos de massa efetiva de analito depositada no substrato (limite de detecção absoluto, LDA ou limite de quantificação absoluto, LQA) considerando 5 μ L de amostra, o que permite avaliar a capacidade de detecção em termos de massa.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados de LD, LDA, LQ e LQA obtidos para a CPT na condição otimizada em substratos de celulose e de nylon. Os resultados da CPT-11 na condição otimizada pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 9: Dados da capacidade de detecção da CPT depositada em substratos de celulose nos espectros de varredura normal (N) e derivada de 2ª ordem (D) e no substrato de nylon

Parâmetros de detectabilidade da CPT	Celulose		Nylon
	N	D	
LD (mol L ⁻¹)	1,5 x 10 ⁻⁵	9,4 x 10 ⁻⁶	7,2 x 10 ⁻⁶
LDA (ng)	26,8	16,4	12,5
LQ (mol L ⁻¹)	2,4 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻⁵	8,6 x 10 ⁻⁶
LQA (ng)	42,3	27,5	14,9

(N) Varredura normal em 570 nm

(D) Varredura da derivada de 2ª ordem em 367 nm

Tabela 10: Dados da capacidade de detecção da CPT-11

Parâmetros de detectabilidade da CPT-11	Celulose
LD (mol L ⁻¹)	2,4 x 10 ⁻⁵
LDA (ng)	79,6
LQ (mol L ⁻¹)	2,9 x 10 ⁻⁵
LQA (ng)	99,9

Algumas situações são percebidas nos dados da Tabela 9. Primeiramente, existe uma significativa melhoria dos parâmetros de detectabilidade quando os resultados obtidos em nylon são confrontados com os obtidos em celulose, nas mesmas condições de medição de sinal (varredura normal e medição em 570 nm). Os limites, três vezes menores obtidos com o nylon é consequência do menor sinal de fundo (x) e sua variação (s), que são os parâmetros do critério escolhido. Vale lembrar que o nylon também permite observação de fosforescência mais intensa para a CPT, logo, qualquer critério de detectabilidade que considere a inclinação da curva analítica (m) também indicará valores melhores de LD, LQ e de seus respectivos valores absolutos. Quando se compara as abordagens diferentes de varredura, a melhora de detectabilidade usando medição no λ_{iso} do espectro derivado é em torno da metade do valor do obtido na medição no máximo de emissão do espectro normal. Esse aumento, a primeira vista é contraditório, pois os valores de sinal do analito tendem a diminuir quando medidos nos λ_{iso} após derivação. No entanto, pelo critério escolhido, o sinal de fundo e sua variabilidade é o

parâmetro principal, e nesse caso, a derivação comprimiu o fundo do substrato de celulose para regiões abaixo de 300 nm, permitindo a medição do λ_{iso} em ambiente de sinal de fundo baixo. Interessante salientar, que mesmo usando critérios que utilizam o “m” da curva, como o 3s/m, o valor de detectabilidade é melhorado ($6,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para medição em varredura normal e $2,74 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em medição no λ_{iso} após derivação). Isso mostra a importância crítica de se conhecer as características do sinal de fundo na medição analítica, como mostrado na Figura 34 o sinal típico do substrato de celulose (banda de excitação) antes e após derivação de 2^ª ordem.

4.2.3. Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do sinal analítico manter-se inalterado após pequenas variações de um ou mais parâmetros do método, sendo, por isso mesmo, avaliada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das conseqüências.

A robustez foi obtida por ocasião das otimizações, estudos univariados e multivariado. O método é considerado robusto para um determinado parâmetro quando a variação deste for maior ou igual a 10% (comparação entre a tolerância e média da faixa)⁵⁵.

Foram escolhidos dois parâmetros para demonstrar essa avaliação: o valor de pH da solução tampão usada na preparação da solução da CPT e a variação de massa do sal de átomo pesado no caso da CPT-11. Os resultados podem ser observados na Tabela 11, onde os métodos foram considerados robustos por apresentarem a variação maior que 10%.

Tabela 11: Avaliação da Robustez para o CPT e CPT-11.

CPT	Faixa de pH	Varição (%)
		9-12 ($10,5 \pm 1,5$)
CPT-11	Massa molar de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (μg)	Varição (%)
		563-729 (646 ± 83)

4.2.4. Precisão

O parâmetro que avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições pré-estabelecidas é a precisão do processo analítico, sendo normalmente determinado para circunstâncias específicas de medição. As duas maneiras mais utilizadas para expressar a precisão de um método são a repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo(s) desvio(s) padrão e desvio(s) padrão relativo(s) (RSD) ou coeficiente(s) de variação (CV%). Vale lembrar que a repetitividade e a reprodutibilidade contribuem apenas com parte da incerteza da medição.

A repetitividade foi calculada conforme documento do INMETRO⁷⁷, como indicado na equação 4.

$$CV(\%) = \frac{S_r}{M_{\text{medição}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: “S_r” é a estimativa do desvio padrão de no mínimo sete replicatas e “M_{medição}” é a média de no mínimo sete determinações.

Neste trabalho foi calculada a reprodutibilidade interna, tendo sido o analista a fonte de variação de medição. Uma vez escolhida a fonte de variação, as estimativas das variâncias (dentro e entre os grupos) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), no programa Excel (Microsoft Office). A reprodutibilidade é obtida através da soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas, conforme demonstrado na Equação 5, Equação 6 e Equação 7.

$$s_{\text{entre}}^2 = (MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}) / n \quad \text{Equação 5}$$

$$s_r^2 = MQ_{\text{dentro}} \quad \text{Equação 6}$$

$$s_R^2 = (s_r^2 + s_{\text{entre}}^2) \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

S_R² é a soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas, MQ_{entre} é a soma dos mínimos quadrados entre os analistas e MQ_{dentro} é a soma dos mínimos quadrados de cada analista.

A repetitividade (s_r ou CV%) e a reprodutibilidade (s_R) foram medidas em três concentrações diferentes ao longo da curva analítica nas condições otimizadas para os dois alcalóides. A repetitividade foi realizada com troca de substrato (limitação da técnica SSRTP, pois para cada medição da fosforescência no equipamento é necessário a deposição do analito no substrato sólido) e a reprodutibilidade foi realizada com medições feitas por dois diferentes analistas. No caso da CPT o estudo foi realizado em celulose e em nylon, conforme pode ser observado na Tabela 12 e na Tabela 13.

Tabela 12: Valores do CV (%) nos três pontos da curva analítica da CPT depositada em substratos de celulose (espectros de varredura normal, N e varredura de 2ª derivada, D) e depositada em substratos de nylon.

CPT	Substrato de celulose				Substrato de nylon			
	Concentração (mol L ⁻¹)	CV (%)		s_R (%)		Concentração (mol L ⁻¹)	CV (%)	s_R (%)
		N	D	N	D			
1ª	2.4×10^{-5}	14	7	3	1	9.0×10^{-6}	14	3
2ª	4.8×10^{-5}	6	5	1	3	3.2×10^{-5}	6	1
3ª	7.4×10^{-5}	6	6	1	9	5.5×10^{-5}	3	1

Tabela 13: Valores do CV (%) nos três pontos da curva analítica da CPT-11 depositada em substratos de celulose.

CPT-11	Substrato de celulose		
	Concentração (mol L ⁻¹)	CV (%)	s_R (%)
1ª	3.0×10^{-5}	12	3
2ª	4.5×10^{-5}	4	1
3ª	7.5×10^{-5}	4	1

Os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que em geral nas técnicas de SSRTP, são reportados resultados de repetitividade de até 15%, dependendo da complexidade da amostra. Isso ocorre devido às variações de sinais produzidos pela pouca homogeneidade nos substratos de celulose, os quais apresentam dispersão no sinal de fundo, e principalmente pela variação de posição da amostra no centro do substrato.

Comparando os resultados obtidos com a CPT depositada no substrato de celulose e de nylon, não foi observada nenhuma diferença significativa em

relação a este parâmetro. Os resultados indicam que o principal fator que afeta a repetitividade não é a variação do sinal de fundo do substrato, mas sim a variação da posição da gota de amostra na região central do substrato.

Cabe ressaltar ainda, que os valores obtidos pela repetitividade foram bem maiores que os valores da reprodutibilidade, indicando que as variações de sinal do substrato, e mais do que isso, as variações de posição da amostra no centro do substrato (como provado com o uso do nylon) são os fatores mais relevantes na degradação da precisão.

4.2.5. Incerteza de medição de fosforescência

A avaliação metrológica mais rigorosa na química analítica proporciona melhorias na qualidade das medições e garante que a informação obtida esteja o mais próximo da realidade, levando em conta as limitações do processo analítico (amostragem, preparação de amostra, medição instrumental). Assim, a estimativa da incerteza de medição tem um papel crucial para estabelecer a confiabilidade dos resultados e indicar as etapas mais críticas do processo analítico no que diz respeito à precisão⁷⁸.

As incertezas para este estudo foram estimadas com base no trabalho realizado por Cunha et. al.⁷⁸. Neste trabalho um diagrama de causa e efeito para a medição da fosforescência por SS RTP foi confeccionado (Figura 43), onde as fontes mais relevantes foram selecionadas: (i) repetitividade (u_r), (ii) reprodutibilidade (u_R), (iii) curva analítica (u_{curva}) e (iv) soluções críticas (u_s). A partir desses dados foram calculadas as incertezas combinada (u_c) e expandida ($U_{95\%, k=2}$).

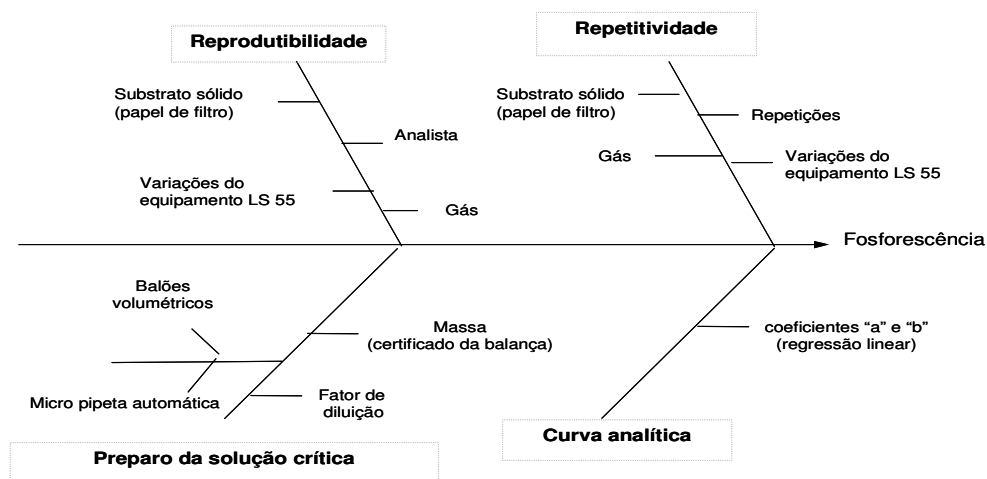


Figura 42: Diagrama de causa e efeito para medição de fosforescência por SS RTP⁷⁸.

As Tabelas (Tabela 14, Tabela 15 e Tabela 16) apresentam um resumo das incertezas calculadas: Tabela 14 - CPT depositada em substratos de celulose com medição em 570 nm do espectro obtido por varredura normal e em 367 nm no espectro de emissão derivado de 2ª ordem (entre parênteses); Tabela 15 - CPT depositada em substratos de nylon com medição em 570 nm do espectro obtido por varredura normal e Tabela 16 - CPT-11 depositada em substratos de celulose com medição em 570 nm do espectro obtido por varredura normal. Em todos os casos, as incertezas foram calculadas em três diferentes concentrações nas condições previamente otimizadas e validadas.

A incerteza associada à repetitividade da amostra (u_r) foi calculada pela estimativa do desvio padrão " s_r ", com dez repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições, mas em diferentes substratos. E a incerteza associada à reprodutibilidade da amostra foi calculada pela estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade " s_R ", por meio de 10 substratos distintos de uma mesma amostra para cada analista, sob as mesmas condições. A estimativa da incerteza da reprodutibilidade (u_R) foi calculada pelo método ANOVA, pela soma dos quadrados dos desvios da repetitividade de cada analista " s_r " e entre os analistas " s_{entre} ", conforme Equação 8.

$$s_r^2 = \sqrt{(s_r^2 + s_{entre}^2)} \quad \text{Equação 8}$$

A estimativa da incerteza da componente "curva" foi calculada com base nos coeficientes da curva analítica, Equação 9.

$$u_{curva} = \sqrt{[(c_{i_a}^2 \times s^2 a) + (c_{i_b}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{i_a} \times c_{i_b} \times u_a \times u_b \times r)]} \quad \text{Equação 9}$$

onde: c_{i_a} é o coeficiente de sensibilidade igual a $\frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2}$ ("b" interceptação da reta); c_{i_b} é o coeficiente de sensibilidade igual a $-1/a$ ("a" inclinação da reta); u_a é a incerteza de "a" e é igual a $\sqrt{s^2 a}$ (" $s^2 a$ " = $\frac{s^2 \times \sum C^2}{D}$); u_b é a incerteza de "b" e é igual a $\sqrt{s^2 b}$ (" $s^2 b$ " = $\frac{n \times s^2}{D}$); D é o desvio padrão

igual a $(n \times \sum C^2) - (\sum C)^2$; "C" é a concentração em mol L⁻¹ e "r" é a razão entre "a, b" e é igual a $-\frac{\sum C}{\sqrt{(n \times \sum C^2)}}$.

Os parâmetros massa pesada do analito, micropipeta e balão volumétrico contribuem na estimativa da incerteza associada ao preparo de soluções críticas, conforme descrito. Assim, a incerteza associada ao preparo de soluções críticas (u_s) foi calculada conforme a Equação 10.

$$u_s = \sqrt{\left(\left(\frac{u_{mp1}}{K} \right)^2 + \left(\frac{u_{mp2}}{K} \right)^2 + \left(\frac{u_{bv}}{K} \right)^2 \right) \times (u_{fd}) + \left(\frac{u_{bal}}{K} \right)^2} \quad \text{Equação 10}$$

onde: " u_{mp1} " é a incerteza da micropipeta de 100-1000 μL , " u_{mp2} " é a incerteza da micropipeta de 5 μL , " u_{bv} " é a incerteza do balão volumétrico, " u_{fd} " é a incerteza do fator de diluição, " u_{bal} " é a incerteza da balança e, K é o fator de abrangência de cada componente. A razão entre o valor da incerteza expandida expressa no certificado de calibração do material "U" e o fator de abrangência "k" será a incerteza combinada (u_c) utilizada na equação.

A incerteza combinada (u_c) e a incerteza expandida (U) para um nível de 95% de confiança foram calculadas com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza, conforme cálculo apresentado nas equações 11 e 12, respectivamente.

$$u_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_s^2 + u_{curva}^2)} \quad \text{Equação 11}$$

$$U = u_c \times K \quad \text{Equação 12}$$

Tabela 14: Resultados de incertezas da medição da fosforescência da CPT em substratos de celulose em diferentes concentrações: $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (41,8 ng); $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (83,6 ng) e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (128,9 ng) nos espectros de varredura normal. Os valores da obtidos pela 2ª derivada encontram-se dentro dos parênteses.

<i>Incertezas associadas</i>	<i>Valores de incerteza (mol L^{-1})</i>		
u_r	$3,23 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$	$4,06 \times 10^{-6}$
	(1,94 x 10⁻⁶)	(2,24 x 10⁻⁶)	(3,82 x 10⁻⁶)
u_R	$7,04 \times 10^{-7}$	$7,11 \times 10^{-7}$	$9,36 \times 10^{-7}$
	(2,25 x 10⁻⁷)	(1,28 x 10⁻⁶)	(6,04 x 10⁻⁶)
<i>Balão volumétrico 5 mL (u_{mp}, cert. *)</i>			
	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$
<i>Micropipeta (100 - 1000μL) (u_{mp}, cert. *)</i>			
	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$
<i>Micropipeta 5μL (u_{mp}, cert. *)</i>			
	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$
<i>Fator de diluição (u_f)</i>			
	$1,4 \times 10^{-1}$	$7,0 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$
u_s	$5,28 \times 10^{-7}$	$3,73 \times 10^{-7}$	$3,01 \times 10^{-7}$
<i>Coeficiente linear (u_b)</i>			
	$5,07 \times 10^2$	$5,07 \times 10^2$	$5,07 \times 10^2$
	(4,44 x 10¹)	(4,44 x 10¹)	(4,44 x 10¹)
<i>Sensibilidade (u_m)</i>			
	$1,53 \times 10^{11}$	$1,53 \times 10^{11}$	$1,53 \times 10^{11}$
	(1,51 x 10¹⁰)	(1,51 x 10¹⁰)	(1,51 x 10¹⁰)
u_{curva}	$1,45 \times 10^{-6}$	$1,45 \times 10^{-6}$	$1,45 \times 10^{-6}$
	(6,78 x 10⁻⁶)	(6,78 x 10⁻⁶)	(6,78 x 10⁻⁶)
u_c	$3,65 \times 10^{-6}$	$3,48 \times 10^{-6}$	$4,43 \times 10^{-6}$
	6,36 ng	6,06 ng	7,72 ng
	(7,08 x 10⁻⁶)	(7,27 x 10⁻⁶)	(9,86 x 10⁻⁶)
	(12,33 ng)	(12,66 ng)	(17,17 ng)
$U_{(95\%, k=2)}$	$7,30 \times 10^{-6}$	$6,96 \times 10^{-6}$	$8,85 \times 10^{-6}$
	12,71 ng	12,12 ng	15,41 ng
	(1,42 x 10⁻⁵)	(1,45 x 10⁻⁵)	(1,97 x 10⁻⁵)
	(24,73 ng)	(25,26 ng)	(34,31 ng)

*cert.: valor obtido do certificado de calibração ($U_{mp(k=2, 95\%)}$), $u_{mp} = U_{mp}/k$.

Tabela 15: Resultados de incerteza da medição da fosforescência do CPT em substrato de nylon com diferentes concentrações: $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (15,7 ng); $3,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (55,7 ng) e $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (95,8 ng).

<i>Incertezas associadas</i>	<i>Valores de incerteza (mol L⁻¹)</i>		
u_r	$1,37 \times 10^{-6}$	$1,73 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-6}$
u_R	$5,73 \times 10^{-7}$	$1,78 \times 10^{-7}$	$4,79 \times 10^{-7}$
<i>Balão volumétrico 5 mL (u_{mp}, cert. *)</i>	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$
<i>Micropipeta (100 - 1000μL) (u_{mp}, cert. *)</i>	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$
<i>Micropipeta 5μL (u_{mp}, cert. *)</i>	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$
<i>Fator de diluição (u_f)</i>	$4,70 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-1}$	$6,00 \times 10^{-2}$
u_s	$6,69 \times 10^{-7}$	$1,47 \times 10^{-7}$	$8,42 \times 10^{-8}$
<i>Coefficiente linear (u_b)</i>	$2,12 \times 10^2$	$2,12 \times 10^2$	$2,12 \times 10^2$
<i>Sensibilidade (u_m)</i>	$1,40 \times 10^{11}$	$1,40 \times 10^{11}$	$1,40 \times 10^{11}$
u_{curva}	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$
u_c	$1,99 \times 10^{-6}$ (3,46 ng)	$2,22 \times 10^{-6}$ (3,87 ng)	$1,79 \times 10^{-6}$ (3,12 ng)
$U_{(95\%, k=2)}$	$3,98 \times 10^{-6}$ (6,93 ng)	$4,44 \times 10^{-6}$ (7,73 ng)	$3,59 \times 10^{-6}$ (6,25 ng)

*cert.: valor obtido do certificado de calibração ($U_{mp(k=2, 95\%)}$), $u_{mp} = U_{mp}/k$.

Tabela 16: Resultados de incerteza da medição da fosforescência do CPT-11 em diferentes concentrações: $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (101,6 ng); $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (152,4 ng) e $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (253,9 ng)

<i>Incertezas associadas</i>	<i>Valores de incerteza (mol L⁻¹)</i>		
u_r	$1,83 \times 10^{-6}$	$1,83 \times 10^{-6}$	$1,83 \times 10^{-6}$
u_R	$6,03 \times 10^{-7}$	$6,03 \times 10^{-7}$	$6,03 \times 10^{-7}$
<i>Balão volumétrico 5 mL (u_{mp}, cert. *)</i>	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$
<i>Micropipeta (100 - 1000μL) (u_{mp}, cert. *)</i>	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$
<i>Micropipeta 5μL (u_{mp}, cert. *)</i>	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$	$2,16 \times 10^{-8}$
<i>Fator de diluição (u_f)</i>	$2,2 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$9,0 \times 10^{-2}$
u_s	$6,63 \times 10^{-7}$	$5,46 \times 10^{-7}$	$4,22 \times 10^{-7}$
<i>Coeficiente linear (u_b)</i>	$2,85 \times 10^2$	$2,85 \times 10^2$	$2,85 \times 10^2$
<i>sensibilidade (u_m)</i>	$6,13 \times 10^{10}$	$6,13 \times 10^{11}$	$6,13 \times 10^{11}$
u_{curva}	$1,60 \times 10^{-6}$	$1,60 \times 10^{-6}$	$1,60 \times 10^{-6}$
u_c	$2,59 \times 10^{-6}$ (8,77 ng)	$2,57 \times 10^{-6}$ (8,70 ng)	$2,54 \times 10^{-6}$ (8,6 ng)
$U_{(95\%, k=2)}$	$5,19 \times 10^{-6}$ (17,57 ng)	$5,13 \times 10^{-6}$ (17,37 ng)	$5,08 \times 10^{-6}$ (17,2 ng)

*cert.: valor obtido do certificado de calibração ($U_{mp(k=2, 95\%)}$), $u_{mp} = U_{mp}/k$.

Os resultados obtidos para o cálculo da incerteza da CPT nas três diferentes concentrações mostraram que para o analito na concentração mais diluída uma percentagem de 15% (28% na medição realizada pelo espectro da derivada) foi obtida, sendo este valor satisfatório por estar próximo ao LD do método. Para as outras duas concentrações, as incertezas associadas à medição de fosforescência foram de 6% ao longo da curva (15 e 16% ao usar o espectro da derivada de 2ª ordem).

No caso da CPT depositada no substrato de nylon, as percentagens relativas das incertezas foram de 19% para o analito mais diluído, 7 e 4% para as demais concentrações, o que era esperado, já que o início da curva é o ponto mais crítico e menos preciso. Considerando o comportamento acima, espera-se que no nylon, esses valores dobrem com o uso de medição em espectro de derivada de 2ª ordem.

Comparando os resultados obtidos nos substratos de celulose e nos de nylon, não aconteceu diferença significativa nas incertezas observadas nos dois substratos porque a maior fonte de incerteza encontrada foi a repetitividade (ver abaixo), e como esta apenas apresentou pequenas melhoras no substrato de nylon, as percentagens relativas das incertezas não sofreram grandes influências.

Similarmente aos resultados obtidos para a CPT, a CPT-11 também apresentou o maior valor na menor concentração do analito sendo de 9%, confirmando que a maior fonte de incerteza encontra-se nos valores onde a concentração está próxima ao LD. Depois foi observada uma diminuição na percentagem da incerteza, obtendo 6 e 3% para a substância em soluções mais concentradas.

Uma vez identificada e calculada a incerteza de cada componente, é possível verificar quais componentes são mais relevantes no processo de medição. Os gráficos de barras da CPT (Figura 44) depositada no substrato de celulose nas três diferentes concentrações ($2,4 \times 10^{-5}$; $4,8 \times 10^{-5}$ e $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) apresentam as contribuições de cada componente de incerteza para cada condição estudada.

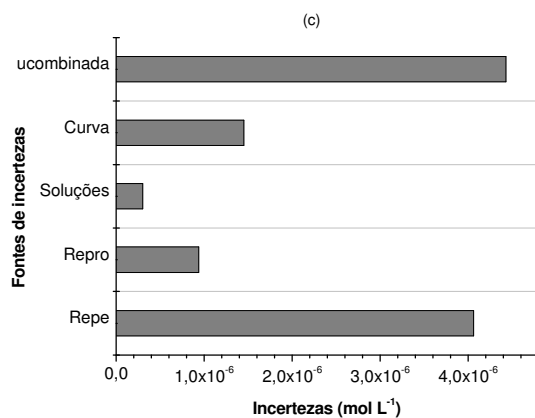
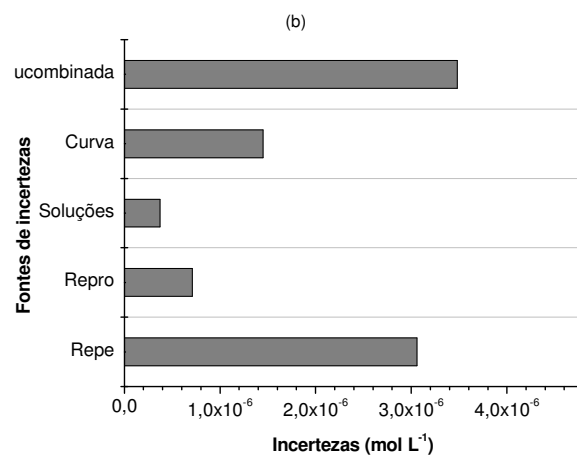
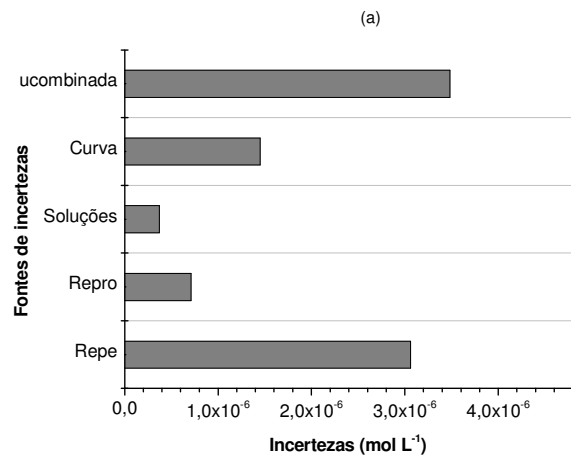


Figura 43: Gráficos de contribuição das fontes de incerteza da CPT em diferentes concentrações no substrato de celulose: (a) $2,4 \times 10^{-5}$, (b) $4,8 \times 10^{-5}$ e (c) $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

Na Figura 45, são apresentados os gráficos de barras da CPT depositada no substrato de nylon nas três diferentes concentrações ($9,0 \times 10^{-6}$; $3,2 \times 10^{-5}$ e $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

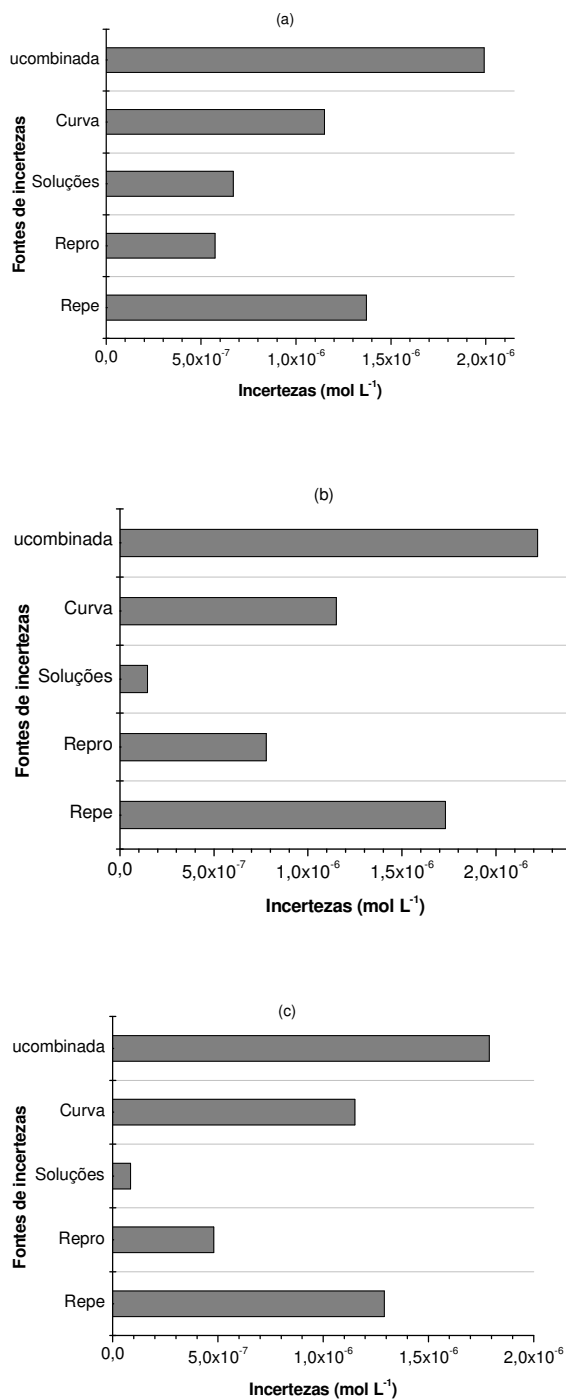


Figura 44: Gráficos de contribuição das fontes de incerteza da CPT em diferentes concentrações no substrato de nylon: (a) $9,0 \times 10^{-6}$ (b) $3,2 \times 10^{-5}$ (c) $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Na Figura 46 observam-se os gráficos de contribuição das diferentes fontes de incerteza na medição de fosforescência da CPT-11 em diferentes concentrações ($3,0 \times 10^{-5}$; $4,5 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

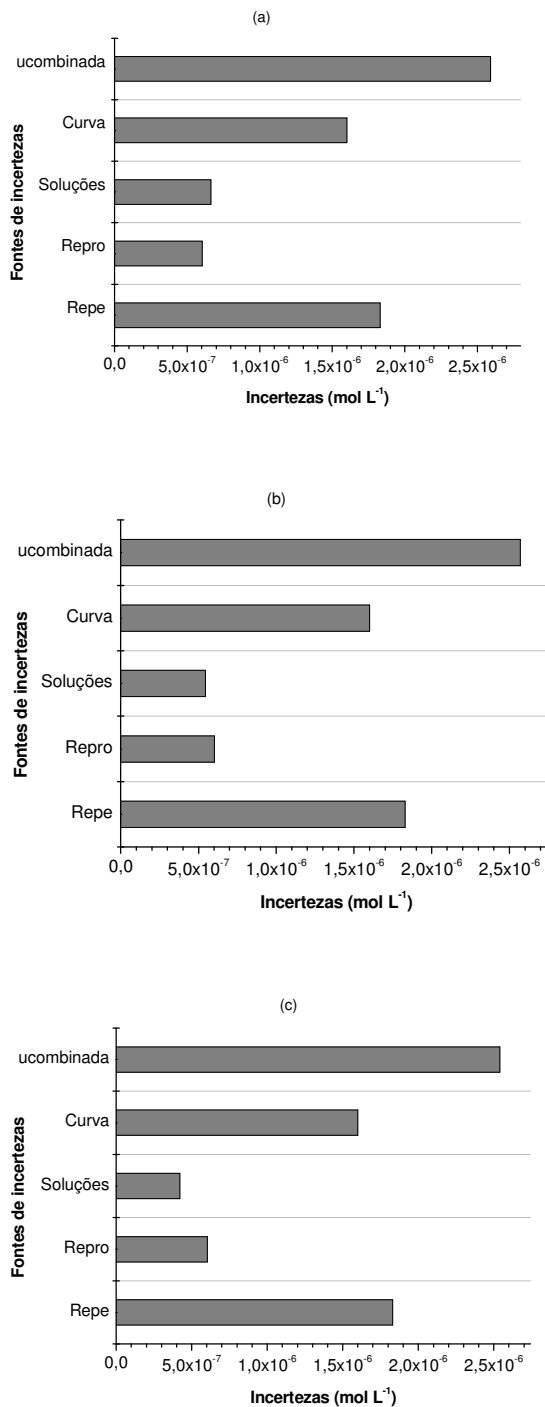


Figura 45: Gráficos de contribuição das fontes de incerteza da CPT-11 em diferentes concentrações: (a) $3,0 \times 10^{-5}$ (b) $4,5 \times 10^{-5}$ (c) $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Os resultados mostraram que a repetitividade é a fonte que mais influencia na incerteza do método usando ambos os substratos. Era esperada uma pequena influência da repetitividade na incerteza do método, pelo fato do nylon apresentar um sinal de fundo baixo, estável e uniforme. Porém, tanto no nylon quanto na celulose a magnitude da contribuição da repetitividade foi equivalente, o que mostra que a melhora na homogeneidade do sinal de fundo do substrato nylon não tem impacto na minimização da repetitividade. A fonte principal da repetitividade está relacionada com a variação da posição da gota de amostra na região central do substrato onde incide a radiação de excitação, gerando a dispersão dos resultados. Estudos mais detalhados estão previstos.

4.3. Aplicação do método

A aplicabilidade do método para a determinação de traço de CPT foi verificada por meio de testes de recuperação nos medicamentos Camptosar (formulação farmacêutica contendo CPT-11) e Hyncantim (formulação farmacêutica contendo TPT) e fortificando as matrizes de urina e saliva.

Para a determinação do princípio ativo do anticâncer injetável de CPT-11 a aplicação do método foi avaliada no medicamento Camptosar.

4.3.1. Recuperação em amostras

Para a determinação de CPT nos medicamentos contendo CPT-11 e TPT (CPT: CPT-11: TPT, na proporção 1:1:1) fez-se necessário o preparo das amostras comerciais de modo a garantir a concentração esperada de CPT-11 e de TPT ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), similar a concentração da solução padrão de CPT utilizada nos estudos anteriores. Alíquotas dessas soluções de CPT, CPT-11 e TPT foram transferidas para balão volumétrico contendo solução tampão Britton-Robinson pH 10,5 (50% v/v), ajustando o volume final com água ultrapurificada para a obtenção da solução de trabalho ($4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Similarmente soluções individuais dos analitos foram preparadas na concentração de $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram depositadas em substrato de celulose para a determinação fosforimétrica. Na Figura 47 são mostrados os espectros da recuperação da CPT em medicamentos. Os resultados de recuperação encontrados nas análises de medicamentos foram de $101,5 \pm 5,5\%$, indicando boa exatidão do método.

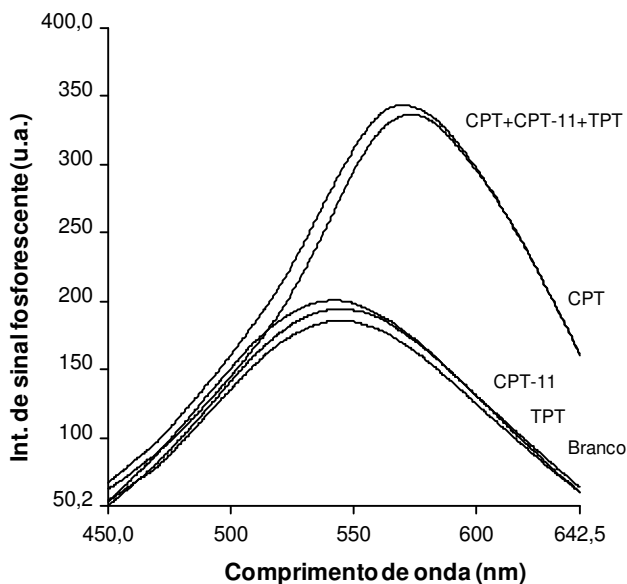


Figura 46: Espectros de emissão da recuperação da CPT ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em formulações farmacêuticas (CPT-11 e TPT).

Para avaliar a recuperação da CPT na matriz de urina e de saliva alíquotas da solução de CPT foram transferidas para balões volumétricos contendo solução tampão Britton-Robinson em pH 10,5, (50%v/v) ajustando o volume final com urina ou saliva. Para urina, fez necessária a limpeza prévia da amostra por meio de procedimento para separação das proteínas conforme descrito no Capítulo 2. A concentração de CPT nas soluções de amostra foi $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O sinal obtido foi comparado ao de uma solução padrão de CPT de concentração equivalente ao das amostras com fluido biológico. Os resultados de recuperação encontrados nas análises de urina e saliva foram satisfatórios: $102,5 \pm 3,5\%$ e $102,5 \pm 4,5\%$, respectivamente.

Da mesma forma, um estudo de aplicabilidade do método foi programado separadamente com o medicamento contendo CPT-11. O procedimento de preparação foi ajustado para que a concentração esperada da CPT-11 no medicamento fosse de $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, similar a concentração da solução padrão da CPT-11. Alíquotas da solução padrão e da solução do medicamento contendo CPT-11 foram transferidas para balões volumétricos e ajustadas com água ultrapurificada para se obter solução de trabalho de $5,5 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram depositadas no substrato de celulose para determinação fosforimétrica.

Os valores de recuperação encontrados nas análises dos medicamentos foram satisfatórios ($97,5 \pm 5,5\%$) para a determinação do princípio ativo da CPT-11 no medicamento camptosar, conforme pode ser observado nos espectros de emissão do padrão e do medicamento de CPT-11 na concentração de $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 48).

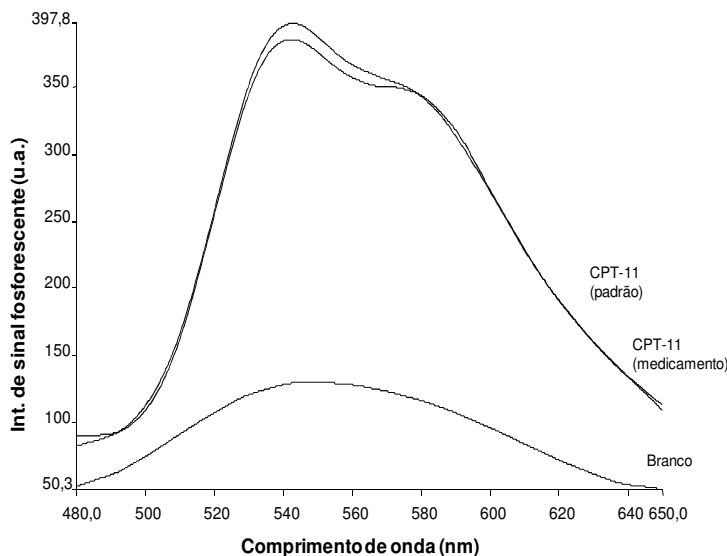


Figura 47: Espectros de emissão da recuperação da CPT-11 em medicamento.

4.3.2. Comparação com HPLC

Neste trabalho foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos usando o método em desenvolvimento (SSRTP) e os resultados obtidos por meio de um método de referência (HPLC-DF), avaliando o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao alcançado com o método de referência. As determinações foram efetuadas em replicatas autênticas (com soluções independentes da amostra), utilizando o método em desenvolvimento e o método de referência, em uma faixa de concentração comum e na qual se pretende validar o método. A comparação entre os métodos SSRTP e HPLC foi feita por comparação entre médias aplicando o teste t de Student. As análises das amostras por SSRTP foram realizadas em seis replicatas autênticas para a CPT e em 5 replicatas autênticas para a CPT-11, as mesmas soluções de analito foram analisadas por HPLC. No caso da CPT, as análises por HPLC foram realizadas com a mesma solução de

analito (mesma concentração), mas em pH não ajustado da solução, devido a problemas que poderiam ocorrer à coluna cromatográfica em meio fortemente básico. Curvas analíticas nas mesmas condições também foram realizadas com o intuito de minimizar possíveis erros.

De acordo com os resultados obtidos para os dois analitos, $t_{\text{calc.}} < t_{\text{tab.}}$, para um nível de 95% de confiança os resultados foram satisfatórios, como pode ser observado na Tabela 17 e na Tabela 18.

Tabela 17: Resultado do teste da comparação entre SSRTP e HPLC para a CPT.

N° de replicatas	Valor medido (mol L ⁻¹)	
	SSRTP*	HPLC-DF**
1	5,50E-05	5,80E-05
2	5,80E-05	6,30E-05
3	3,88E-05	4,90E-05
4	5,45E-05	6,76E-05
5	5,43E-05	6,13E-05
6	5,35E-05	6,38E-05
Média	5,23E-05	6,05E-05
Desvpad	6,82E-06	6,43E-06
<i>n° de replicatas(n)</i>	6	6
Desvpadcomb.	7,63E-14	
<i>S_p</i>	2,E-05	
<i>t_o</i>	0,89	
<i>t_{tabelado}</i>	2,228	
	GL=	10

* valores medidos por SSRTP em presença de TI(I) e pH 10.5

**valores medidos por HPLC com detecção por fluorescência em pH não ajustado da solução de analito

Tabela 18: Resultado do teste da comparação entre SSRTP e HPLC para a CPT-11.

N° de replicatas	Valor medido (mol L ⁻¹)	
	SSRTP*	HPLC-DF
1	3,90E-05	4,16E-05
2	4,40E-05	3,49E-05
3	4,70E-05	4,50E-05
4	3,80E-05	4,05E-05
5	3,70E-05	4,58E-05
Média	4,10E-05	4,16E-05
Desvpad	4,30E-06	4,34E-06
<i>n</i> ° de replicatas(<i>n</i>)	5	5
Desvpadcomb.	6,99E-16	
<i>S_p</i>	9,E-06	
<i>t₀</i>	0,09	
<i>t_{tabelado}</i>	2,306	

GL= 8

* valores medidos por SSRTP em presença de Pb(II) + SDS