



Ana Catalina Palacios Osorio

**Métodos analíticos baseados na indução
fotoquímica de fluorescência: Aplicações
espectrofluorimétricas e cromatográficas para a
determinação de tetrabenzazina, amitriptilina e
vareniclina**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadores: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha

Rio de Janeiro, setembro de 2013



Ana Catalina Palacios Osorio

**Métodos analíticos baseados na indução
fotoquímica de fluorescência: Aplicações
espectrofluorimétricas e cromatográficas para a
determinação de tetrabenazina, amitriptilina e
vareniclina**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha

Co-orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Anníbal Duarte Pereira Neto

UFF

Prof. Arthur de Lemos Scofield

Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Fátima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega

UFSCar

Prof. Wagner Felipe Pacheco

UFF

Jose Eugênio Leal

Coordenador(a) Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 19 de setembro de 2013

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Ana Catalina Palacios Osorio

Formada em Química (2008) pela Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). Atuou durante 4 anos na monitoria de Análise Inorgânica, Análise Instrumental, Tecnologia de Alimentos e Fisicoquímica na Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia da USAC. Trabalhou na pesquisa de síntese e identificação de compostos orgânicos a partir de produtos naturais na Dirección General de Investigación, da USAC. Foi selecionada pelo Ministério da Economia da Guatemala para fazer parte do projeto de Formación de Metrologos para el Sistema Nacional de la Calidad, para realizar estudos de pós-graduação em Metrologia na PUC-Rio. O trabalho de dissertação do mestrado (2009) intitulou-se Regulação e controle de qualidade como salvaguardas à falsificação de medicamentos.

Ficha Catalográfica

Osorio, Ana Catalina Palacios

Métodos analíticos baseados na indução fotoquímica de fluorescência: Aplicações espectrofluorimétricas e cromatográficas para a determinação de tetrabenazina, amitriptilina e vareniclina / Ana Catalina Palacios Osorio; Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio; co-orientador: Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha - Rio de Janeiro: PUC, Departamento de Química 2013.

[181] f.: il.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química

Incluí referências bibliográficas.

1. Química – Teses. 2. Fluorescência fotoinduzida. 3. Derivatização fotoquímica 4. Espectrofluorimetria. 5. Cromatografia líquida. 6. Tetrabenazina. 7. Vareniclina. 8. Amitriptilina. 9. Incerteza de medição. 10. Química verde. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira da. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Dedico este trabalho aos meus pais pelo carinho, atenção, dedicação e esforço investidos para a minha formação.

Agradecimentos

Ao professor Ricardo Aucélio, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela orientação proporcionada.

À doutora Alessandra Licursi, pela orientação e constante ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da comissão examinadora, por terem aceitado avaliar este trabalho.

À CAPES pelo apoio econômico oferecido durante os estudos de doutorado.

À FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta tese.

À PUC-Rio pela bolsa de isenção e pelo ambiente acadêmico e infra-estrutura favoráveis que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Cássia Ponciano, do departamento de Física da PUC-Rio, e ao professor Anníbal Pereira e à Msc. Caroline Jaegger, do Instituto de Química da UFF, pelo apoio para as análises por espectrometria de massas e GC-MS.

Ao professor Maurício Frota, pelo incentivo para continuar com meus estudos de pós-graduação.

Ao Dr. Sarzamin Khan, pela ajuda sobre a informação dos analitos e nos estudos iniciais de derivatização fotoquímica.

À mestranda Hellen Silva, pelo apoio para poder finalizar este trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da PUC-Rio, pelos ensinamentos e ajuda proporcionada durante meus estudos de doutorado.

Aos meus pais Otto e Flóridalma, minhas irmãs Claudia e Gabriela e minha tia Gloria, pelo constante incentivo.

A meu marido Jaime M. Ticona, pela sua paciência, compreensão e incansável apoio para realizar este trabalho.

À Epifanio e Wilfredo M. Ticona pela ajuda e apoio para finalizar este trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Osorio, Ana Catalina Palacios; Aucélio, Ricardo Queiroz; Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira da. **Métodos analíticos baseados na indução fotoquímica de fluorescência: aplicações espectrofluorimétricas e cromatográficas para a determinação de tetrabenazina, amitriptilina e vareniclina.** Rio de Janeiro, 2013. 181p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A derivatização fotoquímica foi utilizada para induzir ou amplificar a fluorescência de três substâncias utilizadas como princípios ativos em medicamentos: tetrabenazina (TBZ), amitriptilina (AMT) e vareniclina (VRN). Com o aumento de fluorescência após o tratamento com radiação UV, métodos espectrofluorimétricos foram desenvolvidos para determinar a concentração de TBZ, a AMT e a VRN em medicamentos e em matrizes biológicas. A avaliação da abordagem por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência também foi avaliada para a AMT e VRN. Para a determinação de TBZ, a irradiação por 60 min em meio de NaOH ($0,45 \text{ mol L}^{-1}$) permitiu a sua quantificação espectrofluorimétrica com um limite de detecção (LD) de $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e faixa linear até $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O método espectrofluorimétrico foi aplicado para determinar TBZ no medicamento com recuperações entre 88 e 95%. A TBZ também foi determinada em saliva fortificada com o analito em concentração próxima ao do limite de quantificação (LQ) com recuperações maiores que 87%. Estudos usando espectrometria de massas com desorção de plasma estimulada por uma fonte de ^{252}Cf foram realizados para identificar a estrutura do fotoderivado, indicando a fotólise da TBZ via reação de Norrish tipo I e II. Para a determinação de AMT, duas abordagens de derivatização fotoquímica permitiram determinar a substância por espectrofluorimetria e por HPLC. Para o método espectrofluorimétrico, a derivatização foi realizada expondo ao UV por 60 min uma solução de AMT, preparada em HCl $0,027 \text{ mol L}^{-1}$. A faixa de resposta linear se estendeu até $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AMT com um LD de $4,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Na abordagem cromatográfica, o processo de derivatização da AMT foi ajustado utilizando 30 min de UV em tampão fosfato pH 3. O método permitiu um LD de $6,9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ com faixa linear até $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AMT. Os métodos desenvolvidos foram aplicados na determinação de AMT em medicamento e em material de referência farmacopéico com recuperações entre 94 e 105% para o método fluorimétrico e entre 99 e 111%

para a abordagem cromatográfica. A aplicação na determinação da AMT em plasma humano fortificado na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ forneceram resultados aceitáveis. Os fotoderivados fluorescentes foram separados e identificados por GC-MS, sendo proposto um mecanismo de fotólise da AMT. Para a determinação de VRN, a derivatização fotoquímica em meio básico permitiu a determinação da substância por espectrofluorimetria, sendo também avaliada uma abordagem por HPLC. A derivatização da VRN, realizada expondo o analito ao UV por 23 min em solução de NaOH $0,64 \text{ mol L}^{-1}$, permitiu um LD de $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e uma faixa linear até $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As condições de fotoderivatização também foram adaptadas para a determinação cromatográfica do analito, irradiando-o por 10 min em meio de tampão borato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10). A aplicação na determinação da VRN no medicamento com recuperações entre 93 e 102% foi alcançada. Para todos os métodos desenvolvidos foi realizada uma análise metrológica simplificada contemplando as fontes de incerteza mais relevantes para o processo de medição dos analitos: o preparo de soluções; a repetibilidade; a precisão intermediária e a curva analítica. As incertezas de medição para cada um dos métodos propostos foram estimadas em três concentrações distintas, no início, no meio e no fim da faixa linear. Os resultados obtidos foram entre 5,8 e 36% de incerteza do valor nominal das concentrações próximas ao LQ e entre 3,1 e 16% para as concentrações dentro na faixa linear dos métodos. Em todos os métodos desenvolvidos foram utilizados procedimentos de derivatização seguros, energeticamente eficientes e com redução de uso de solventes e substâncias tóxicas, em concordância com os princípios da química verde.

Palavras-chave

Fluorescência fotoinduzida; derivatização fotoquímica; espectrofluorimetria, cromatografia líquida; tetrabenazina; vareniclina; amitriptilina; incerteza de medição; química analítica verde.

Abstract

Osorio, Ana Catalina Palacios; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Cunha Alessandra Licursi Maia Cerqueira da (Co-advisor). **Analytical methods based on photochemically induced fluorescence: spectrofluorimetric and chromatographic applications for the determination of tetrabenazine, amitriptyline and varenicline.** Rio de Janeiro, 2013. 181p. DSc. Thesis - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Photochemical derivatization was employed to induce or amplify the fluorescence from three substances with pharmacological activities: tetrabenazine (TBZ); amitriptyline (AMT) and varenicline (VRN). The substantial fluorescence enhancement after UV irradiation allowed the development of methods based on spectrofluorimetry for TBZ, AMT and VRN. The approach was also evaluated in high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection for the determination of the concentration AMT and VRN in drugs or in biological matrices. For the determination of TBZ, 60 min of UV irradiation of the analyte prepared in NaOH (0.45 mol L^{-1}) allowed its indirect quantification using spectrofluorimetry, with a limit of detection (LOD) of $1.4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and a linear response up to $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Pre-concentration using solid phase extraction improved the LOD in one order of magnitude. The spectrofluorimetric method was applied for the determination of TBZ in a commercial drug, with recoveries between 88 and 95%. TBZ was also determined in analyte fortified saliva at a concentration near the limit of quantitation (LOQ) with recoveries greater than 87%. Studies using plasma desorption mass spectrometry with a ^{252}Cf source, indicated that the photoderivatives of TBZ were obtained through a Norrish Type I and II TBZ photolysis. For the determination of AMT, two photochemical derivatization approaches allowed the determination of the substance by spectrofluorimetry. The approach using HPLC coupled to fluorescence detection was also tested. For the spectrofluorimetric method, the derivatization was achieved after 60 min of UV exposure of a solution of AMT prepared in HCl 0.027 mol L^{-1} . The linear response of the method was up to $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ of AMT, with a LOD of $4.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. For the chromatographic method, the derivatization process was adjusted (30 min of UV irradiation in phosphate buffer, pH 3) in order to adapt the reaction for HPLC. The method allowed an LOD of $6.0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ with a linear range up to $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ of AMT. The determination of AMT in drugs and in a

pharmacopeial reference material was performed, with recoveries between 94 and 105% for the fluorimetric method and between 99 and 111% using HPLC. The analysis of human plasma was also made using AMT ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) fortified samples. The fluorescent photoderivatives were separated and identified by GC-MS, which allowed the proposal of a photolysis mechanism of AMT. For the determination of VRN, the photochemical derivatization in basic medium allowed the determination of the substance by spectrofluorimetry. The derivatization of VRN, performed by exposing the analyte to the UV during 23 minutes in NaOH 0.64 mol L^{-1} , allowed a LOD of $1.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and a linear range extending up to $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The derivatization condition were also adapted for the determination of the analyte using HPLC with fluorimetric detection, by irradiating VRN for 10 min in borate buffer (0.01 mol L^{-1} pH 10). Both methods were applied for the determination of VRN in a commercial drug, with recoveries between 93 and 102%. For all the developed methods, a simplified metrological evaluation was performed, considering the most relevant sources of uncertainty during the measurement process of the analytes studied in this thesis: solution preparation, intra and inter-day precision and the analytical curve. The uncertainty sources for each of the proposed methods were estimated in three different concentrations within the linear range. Measurement uncertainty estimations were between 5.8 and 36% of the nominal concentration in the concentrations near the LOQ and between 3.1 and 16% in the concentrations within the linear range of the methods. Safer, energetically efficient procedures with solvent reduction and without the use of toxic reagents were proposed, in agreement to green chemistry principles.

Keywords

Photoinduced fluorescence; photochemical derivatization; spectrofluorimetry; liquid chromatography; tetrabenazine; varenicline; amitriptyline; measurement uncertainty; green analytical chemistry.

Sumário

1	Introdução	26
1.1.	Objetivos	27
1.2.	Estrutura da tese	28
2	Fundamentação teórica	30
2.1.	Considerações sobre os analitos estudados e os métodos analíticos para a sua determinação	30
2.1.1.	Tetrabenazina	30
2.1.2.	Amitriptilina	33
2.1.3.	Vareniclina	38
2.2.	Fluorescência molecular	40
2.3.	Fluorescência induzida fotoquimicamente	45
2.3.1.	Considerações sobre a derivatização fotoquímica e a aplicação em química analítica	45
2.3.2.	Métodos desenvolvidos para determinar medicamentos após fluorescência fotoinduzida	49
3	Materiais, instrumentação e procedimentos gerais	56
3.1.	Materiais e reagentes	56
3.2.	Instrumentação	57
3.2.1.	Espectrofluorímetro	57
3.2.2.	Cromatógrafos	57
3.2.3.	Espectrômetro de massas	58
3.2.4.	Reatores fotoquímicos	58
3.3.	Instrumentação, equipamentos e softwares complementares	60
3.4.	Procedimentos de medição	60

3.4.1. Análises por espectrofluorimetria	60
3.4.2. Separações cromatográficas	61
3.4.3. Análises por ²⁵² Cf-PDMS	63
3.5. Procedimentos para preparação de soluções e tratamento de amostras	63
3.5.1. Procedimentos de derivatização fotoquímica	65
3.6. Desenvolvimento e validação de métodos	67
3.6.1. Parâmetros analíticos de mérito	68
3.6.2. Cálculo da incerteza de medição	71
3.6.2.1. Incerteza associada à preparação de soluções	73
3.6.2.2. Incerteza associada à curva analítica	74
3.6.2.3. Incerteza associada à repetibilidade e precisão intermediária	75
4 Resultados: Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para determinação de tetrabenazina	76
4.1. Estudos preliminares	76
4.2. Otimização de parâmetros experimentais da derivatização fotoquímica	79
4.3. Estabilidade do fotoderivado e mecanismo de fotoderivatização	85
4.4. Parâmetros analíticos de mérito	89
4.5. Aplicação do método	92
5 Resultados: desenvolvimento de métodos para determinação indireta da amitriptilina	94
5.1. Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para determinação indireta de AMT	94
5.1.1. Estudos preliminares	94
5.1.2. Otimização de parâmetros experimentais para a derivatização fotoquímica	99
5.1.3. Estudo de estabilidade de fluorescência e mecanismo da	

fotoderivatização	104
5.1.4. Parâmetros analíticos de mérito	109
5.1.5. Aplicação do método espectrofluorimétrico em medicamento e em material de referência farmacopéico	113
5.2. Adaptação da abordagem para a cromatografia a líquido	115
5.2.1. Adaptação da derivatização fotoquímica da AMT para condições de cromatografia líquida e otimização da separação cromatográfica	115
5.2.2. Parâmetros analíticos de mérito	121
5.2.3. Aplicação do método cromatográfico na determinação indireta da AMT	124
6 Resultados: Desenvolvimento de métodos para determinação indireta da vareniclina	126
6.1. Desenvolvimento do método espectrofluorimétrico para determinação de vareniclina após derivatização fotoquímica	126
6.1.1. Estudos preliminares e otimização das condições de derivatização fotoquímica	126
6.1.2. Otimização das condições de fotoderivatização da VRN	130
6.1.3. Estudo de estabilidade de fluorescência do(s) fotoderivado(s) e proposta de mecanismo de fotoderivatização	135
6.1.4. Parâmetros analíticos de mérito	138
6.1.5. Aplicação do método para análise de VRN em medicamentos	142
6.2. Desenvolvimento de método cromatográfico para determinar VRN	142
6.2.1. Adaptação da derivatização fotoquímica para condições de cromatografia líquida para a determinação indireta da VRN	142
6.2.2. Parâmetros analíticos de mérito	147
6.2.3. Aplicação do método cromatográfico na determinação indireta de VRN em medicamento	149
7 Conclusões e recomendações para trabalhos futuros	151

Referências bibliográficas	155
Anexo A: Resumo de métodos analíticos para determinação de AMT conjuntamente com outros medicamentos	166
Anexo B: Certificados de calibração de equipamentos	168
ANEXO C: Desenhos experimentais preliminares para a otimização das variáveis de fotoderivação da TBZ e AMT	172
ANEXO D: Análises de regressão das curvas analíticas dos métodos desenvolvidos	174

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura da tetrabenazina	30
Figura 2 - Estrutura da amitriptilina	33
Figura 3 - Estrutura da vareniclina	38
Figura 4 - Diagrama de Jablonski modificado (Adaptado de Skoog <i>et al.</i> , 2001)	41
Figura 5 - Etapas em uma reação fotoquímica (Adaptado de Borrell, 1973)	45
Figura 6 - Fotoderivatização da ciprofloxacina e norfloxacina (Adaptado de Mansilla et al, 2005)	54
Figura 7 - Fotoderivatização do clopentixol (Adaptado de Hansen & Hansen, 1994)	55
Figura 8 - Fotoderivatização do rofexocib (Mathews et al., 1999)	55
Figura 9 - Reator fotoquímico I: a) vista frontal e b) esquema de irradiação (1 = lâmpadas germicidas, 2 = tubos de quartzo)	59
Figura 10 - Reator fotoquímico II: (a) esquema lateral (b) circuito elétrico e (c) vista frontal. Esquemas a e b adaptados de Antonio, 2013	59
Figura 11 - Planejamento experimental em estrela mostrando pontos que indicam a combinação de níveis para as variáveis para cada um dos experimentos. Adaptado de Barros Neto et al., 2013	67
Figura 12 - Diagrama de Ishikawa para determinação de fontes de incerteza.	72
Figura 13 - Espectro de absorção molecular da TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , em 99:1 v/v água/ metanol)	76
Figura 14 - Espectro de fluorescência da TBZ ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ; 99:1 v/v água/ metanol) indicando as bandas de excitação e de emissão.	77
Figura 15 - Efeito do tempo de irradiação sobre a fluorescência de soluções de TBZ ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ; NaOH 0,1 mol L ⁻¹) .	80
Figura 16 - Efeito da concentração de NaOH sobre a fluorescência de	

soluções de TBZ ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas por 50 min	81
Figura 17 - a) Gráfico de Pareto e b) superfície de resposta dos resultados do CCD para otimização das variáveis de fotoderivação da TBZ, onde I é intensidade, t é tempo de UV e C é concentração de NaOH.	83
Figura 18 - Espectros de emissão e excitação: a) TBZ ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e fotoderivado e b) brancos antes e após a fotoderivatização	84
Figura 19 - Fluorescência da TBZ ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) medida sob irradiação descontínua em intervalos de 5 min após derivatização fotoquímica (NaOH $0,45 \text{ mol L}^{-1}$, 60 min UV)	85
Figura 20 - Fluorescência medida sob excitação contínua (30 min) de: a) fotoderivado (TBZ $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; NaOH $0,45 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min UV) e b) TBZ ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 99:1 v/v água/ metanol)	86
Figura 21 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da TBZ	87
Figura 22 - Espectro de massas de: a) TBZ ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 100% metanol) e b) fotoderivado (TBZ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 20:80 Metanol/ $\text{Ca(OH)}_{2\text{sat}}$; 60 min UV)	88
Figura 23 - Relação entre a concentração original de TBZ e a fluorescência (230/354 nm) medida após derivatização fotoquímica (NaOH $0,45 \text{ mol L}^{-1}$ e 60 min UV).	89
Figura 24 - Gráficos evidenciando: a) faixa linear da curva analítica obtido da medição de fluorescência (230/354 nm) da TBZ (entre 5×10^{-8} e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) após derivatização fotoquímica (NaOH $0,45 \text{ mol L}^{-1}$ e 60 min UV) e b) respectivo gráfico de resíduos.	90
Figura 25 - Contribuição das fontes de incerteza à incerteza de medição do método espectrofluorimétrico para determinar TBZ, nas três concentrações avaliadas ($5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	92
Figura 26 - Espectro de fluorescência obtida da água e da solução aquosa de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	95
Figura 28 - Fluorescência de soluções de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em distintos meios de reação após exposição ao UV (45 min) e monitorada nos pares de excitação e de emissão de 233/345 nm	

e 263/325 nm.	96
Figura 29 - Espectros de excitação e de emissão de soluções de AMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ nos meios reacionais: (a) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ após 45 min de irradiação com UV.	97
Figura 30 - Fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) monitorada entre 0 e 120 min após derivatização fotoquímica (45 min UV) em a) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (233/345 nm) e b) NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (263/325 nm).	99
Figura 31 - Efeito da concentração de HCl na fluorescência de soluções aquosas de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas por 45 min	99
Figura 32 - Efeito do tempo de exposição ao UV na intensidade de fluorescência de soluções de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em solução aquosa de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	100
Figura 33 - a) superfície de resposta e b) gráfico de Pareto do CCD realizado para a otimização das variáveis de fotoderivatização da AMT (C: concentração de HCl, mol L^{-1} ; t: tempo de UV, min).	102
Figura 34 - Espectro de excitação e de emissão: a) fotoderivado (AMT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min de irradiação UV) e b) AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% água).	103
Figura 35 - Avaliação da estabilidade: a) fotoderivado (AMT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min UV) e b) AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100 % água) sob irradiação incidente contínua.	105
Figura 36 - Avaliação da estabilidade da fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em condições otimizadas de derivatização (HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min UV), medida sob irradiação descontínua, em intervalos de 5 min após a reação fotoquímica.	105
Figura 37 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da AMT em condições otimizadas (HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ irradiada por 60 min).	106
Figura 38 - Cromatograma de íons totais de uma solução de AMT ($9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% acetonitrila) após 30 min de UV.	107
Figura 39 - Espectros de massas de uma solução de AMT ($9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% acetonitrila) por 30 min: (a) AMT; (b) fotoderivado de 206 Da e (c) fotoderivado de 232 Da.	108
Figura 40 - (a) Formação dos fotoderivados da AMT monitorada pela	

- área de pico em função do tempo de irradiação e (b) cinética de reação de fotólise da AMT na derivatização fotoquímica. 109
- Figura 41 - Relação entre a concentração de AMT e a fluorescência após derivatização fotoquímica na condição otimizada (HCl 0,027 mol L⁻¹ e 60 min de exposição ao UV). 110
- Figura 42 - a) Faixa linear do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica (HCl 0,03 mol L⁻¹ e 60 min UV) e b) respectivo gráfico de resíduos 111
- Figura 43 - Contribuição das fontes de incerteza associadas ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT, nas três concentrações avaliadas. 113
- Figura 44 - Cromatogramas do fotoderivado (AMT 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH 3; irradiada por 45 min) e do ensaio do branco em proporções de fase móvel tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹ pH 3)/metanol (v/v) de: (a) 30/70; (b) 40/60; e (c) 50/50; monitorados por detecção de fluorescência em 233/ 345 nm 117
- Figura 45 - Cromatogramas do fotoderivado (AMT 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH 3; 45 min UV) em eluição isocrática e com fase móvel 40/60 v/v (tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH3 /metanol) monitorada em (a) 263/325 nm e (b) 233/345 nm. 118
- Figura 46 - Cromatogramas do fotoderivado (AMT 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH 3; 45 min UV) monitorado por detecção fluorimétrica (263/325 nm) nas proporções de fase móvel de: (a)30:70 e (b) 40:60 v/v (tampão fosfato/ metanol). 119
- Figura 47 - Área de pico do fotoderivado (AMT 1,0 x10⁻⁶ mol L⁻¹; tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹, pH 3) em função do tempo de exposição ao UV. 120
- Figura 48 - Cromatogramas obtidos para: (a) AMT (1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹) e (b) ensaio em branco após tratamento fotoquímico. AMT preparada em tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹, pH 3) exposta por 30 min ao UV. Fase móvel composta por tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹, pH 3)/metanol 40/60 v/v. Detecção fluorimétrica em 263/325 nm. 121
- Figura 49 - a) Curva analítica do método cromatográfico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica (tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹, pH 3; 30 min UV) e b) respectivo gráfico de

resíduos.	122
Figura 50 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método cromatográfico para determinação indireta da AMT, em três concentrações avaliadas ($2,5 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-7}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹).	124
Figura 51 - Espectro de absorção molecular da VRN ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em 100% água).	127
Figura 52 - Espectros de excitação e de emissão da (a) água ultrapura e (b) solução aquosa da VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹).	127
Figura 53 - Efeito da concentração de NaOH na fluorescência de soluções aquosas de VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) irradiadas com UV por 20 min.	130
Figura 54 - Fluorescência da VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) monitorada sob irradiação descontínua, entre 0 e 120 min após derivatização fotoquímica (20 min UV) em NaOH (a) 0,75 mol L ⁻¹ e (b) 0,60 mol L ⁻¹ .	131
Figura 55 - Efeito do tempo de irradiação UV na fluorescência das soluções aquosas de VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em meio de NaOH 0,6 mol L ⁻¹ .	132
Figura 56 - Resultados do planejamento experimental (CCD) para a otimização das variáveis para derivatização fotoquímica da VRN (C = concentração de NaOH ; t = tempo de UV): (a) Superfície de resposta e (b) gráfico de Pareto.	133
Figura 57 - Espectros de excitação e de emissão da VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) (a) após e (b) antes da derivatização fotoquímica (NaOH 0,64 mol L ⁻¹ ; 23 min UV).	135
Figura 58 - Avaliação da estabilidade da fluorescência VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em condições otimizadas de derivatização (NaOH 0,64 mol L ⁻¹ ; 23 min UV), medida sob irradiação descontínua, em intervalos de 5 min após reação fotoquímica.	136
Figura 59 - Avaliação da estabilidade sob irradiação incidente contínua: a) fotoderivado (VRN $2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ ; 0,64 mol L ⁻¹ , 23 min UV) e b) VRN ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹).	136
Figura 60 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da VRN em meio básico (solução a 0,64 mol L ⁻¹ de NaOH exposta ao UV	

- por 23 min) e formação de fotoprodutos fluorescentes. 138
- Figura 61 - Relação entre a concentração da VRN (faixa entre $5,0 \times 10^{-8}$ e $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e a fluorescência medida após derivatização fotoquímica na condição otimizada (23 min UV; 0,638 mol L⁻¹ de NaOH). 138
- Figura 62 - (a) Faixa linear do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica (NaOH 0,638 mol L⁻¹ e 23 min UV) e (b) respectivo gráfico de resíduos. 139
- Figura 63 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica, em três níveis de concentração. 141
- Figura 64 - Espectros de excitação e de emissão do fotoderivado da VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) irradiada por 10 min em meio de tampão borato pH 10 0,01 mol L⁻¹. 143
- Figura 65 - Fluorescência de soluções de VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) irradiadas em meio de (a) NaOH 0,01 mol L⁻¹ e (b) tampão borato pH 0,01 mol L⁻¹ pH 10. 144
- Figura 66 - Cromatogramas obtidos após fotoderivatização da VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; tampão borato pH 10; 0,01 mol L⁻¹ 10 min UV) com eluição isocrática e fase móvel de metanol/tampão borato (pH 10 0,01 mol L⁻¹) nas proporções: (a) 40:60, (b) 45:55 e (c) 50:50 v/v; e detecção fluorimétrica em 257/ 439 nm. 145
- Figura 67 - Área de pico do fotoderivado (VRN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, tampão borato pH 10 0,01 mol L⁻¹) em função do tempo de exposição ao UV. 145
- Figura 68 - Cromatogramas após fotoderivação em condições otimizadas: a) VRN ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e b) ensaio do branco 146
- Figura 69 - (a) Curva analítica obtida por HPLC para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica e (b) respectivo gráfico de resíduos. 147
- Figura 70 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica, nas concentrações avaliadas ($2,5 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). 149

Lista de tabelas

Tabela 1 - Métodos analíticos desenvolvidos para determinar AMT	35
Tabela 2 - Métodos analíticos baseados na indução fotoquímica de fluorescência para determinação de medicamentos	50
Tabela 3 - Fluorescência das soluções de TBZ ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) antes e após exposição ao UV (30 min)	78
Tabela 4 - Pontos experimentais do CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica (concentração de NaOH e tempo de UV) da TBZ	81
Tabela 5 - Resultados do CCD realizado para otimizar as variáveis experimentais (tempo de UV e concentração de NaOH) para a derivatização fotoquímica da TBZ	82
Tabela 6 - Análise de variância dos resultados de otimização, pelo planejamento CCD, das variáveis experimentais para a otimização da derivatização fotoquímica da TBZ.	84
Tabela 7 - Resumo das condições experimentais para derivatização indireta da após derivatização fotoquímica	84
Tabela 8 - Repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da TBZ após derivatização fotoquímica	91
Tabela 9 - Incerteza de medição do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da TBZ após derivatização fotoquímica	91
Tabela 10 - Recuperação de TBZ em amostra de medicamento.	93
Tabela 11 - Razões entre intensidade de sinal após tratamento fotoquímico (I_{final}) e antes tratamento fotoquímico para a AMT (I_{inicial}), nos pares de excitação/ emissão 233/345 nm e 263/325 nm.	98
Tabela 12 - Pontos experimentais do CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica (concentração de HCl e tempo de UV) da AMT.	101
Tabela 13 - Resultados experimentais (intensidade de fluorescência)	

obtidos na otimização dos parâmetros de derivatização fotoquímica da AMT pelo planejamento experimental (CCD) indicado na Tabela 13.	101
Tabela 14 - Análise de variância dos resultados do planejamento experimental CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica da AMT.	102
Tabela 15 - Resumo das condições experimentais para a determinação indireta da fluorescência da AMT após a derivatização fotoquímica	104
Tabela 16 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica na condição otimizada.	112
Tabela 17 - Valores estimados para cada uma das fontes de incerteza e a incerteza de medição associada ao método espectrofluorimétrico para determinação da AMT após derivatização fotoquímica.	112
Tabela 18 - Recuperação em medicamento usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica	114
Tabela 19 - Recuperação em material de referência farmacopéico (INCQS – Fiocruz, Brasil), usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica.	114
Tabela 20 - Recuperações obtidas em testes de pré-concentração de soluções do padrão de AMT $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mL) para $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (10 mL).	115
Tabela 21. - Resumo das condições escolhidas para a determinação cromatográfica da AMT após fotoderivatização.	120
Tabela 22 - Repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação indireta AMT após derivatização fotoquímica por HPLC com detecção fluorimétrica.	123
Tabela 23 - Estimativa da incerteza de medição do método cromatográfico para determinação indireta da AMT, após derivatização fotoquímica.	123
Tabela 24 - Resultados de recuperação da AMT em medicamento utilizando o método cromatográfico proposto e um método de comparação.	125

Tabela 25 - Recuperação de AMT em material de referência farmacopéico (100,0%, INCQS – Fiocruz) pelo método por HPLC-DF para determinação indireta da AMT.	125
Tabela 26 - Parâmetros e níveis escolhidos para o desenho experimental fatorial (2^3) da VRN após derivatização	128
Tabela 27 - Resultados do desenho experimental exploratório (2^3) para avaliar o efeito do tempo de UV, meio de reação e presença de H_2O_2 na fluorescência da solução de VRN exposta ao UV	129
Tabela 28 - Valores para os parâmetros do CCD na otimização das condições de derivatização fotoquímica da VRN	132
Tabela 29 - Resultados (intensidade de fluorescência) obtidos na otimização dos parâmetros de derivatização fotoquímica da VRN pelo CCD.	133
Tabela 30 - Análise de variância dos resultados do planejamento CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica da VRN.	134
Tabela 31 - Condições para a determinação indireta da VRN por espectrofluorimetria pela abordagem de derivatização fotoquímica.	134
Tabela 32 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica na condição otimizada.	140
Tabela 33 - Valores estimados para cada uma das fontes de incerteza de medição associados ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica.	140
Tabela 34 - Recuperação em medicamento usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica.	142
Tabela 35 - Resumo das condições escolhidas para a determinação cromatográfica da VRN após fotoderivatização.	146
Tabela 36 - Repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização fotoquímica	148
Tabela 37 - Estimativa da incerteza de medição do método cromatográfico para determinação indireta da VRN após derivatização	

fotoquímica.	148
Tabela 38 - Resultados de recuperação de VRN no medicamento Champix® utilizando o método cromatográfico desenvolvido	150

Lista de siglas

ACN	Acetonitrila
ACS	<i>American Chemical Society</i>
AMT	Amitriptilina
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis of Variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>The Association of Analytical Communities</i>
ASTM	<i>The American Society for Testing and Materials</i>
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CL	Quimioluminescência (<i>Chemiluminescence</i>)
CV	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar por zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
DAD	Detecção por arranjo de diodos (<i>Diode Array Detection</i>)
DF	Detecção por fluorescência
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	Análise por injeção em fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i>)
FID	Detecção por ionização em chama (<i>Flame Ionization Detection</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
HFBA	Anhidro heptafluorobutírico (<i>Heptafluorobutiric anhydride</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance LC</i>)
HPTLC	Cromatografia em Camada Fina de Alta Eficiência
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografia a Líquido (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar (Micelar electrokinetic chromatography)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NDP	Detecção de nitrogênio-fósforo
PDMS	Espectrometria de massas por desorção de plasma (<i>Plasma desorption MS</i>)
PLS	Mínimos quadrados parciais (<i>Partial Least-Squares</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno ou teflon
PVC	Policloreto de vinila
SIA	Análise por injeção sequencial
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase Extraction</i>)
SIM	Monitoramento de íon único
SPME	Micro-extração em fase sólida (<i>Solid-phase Microextraction</i>)
SPS	Suporte de fase sólida (<i>Solis-phase Support</i>)
TBZ	Tetrabenazina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (<i>Ultra-performance LC</i>)
USEPA	<i>United States Enviromental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
VRN	Vareniclina