

## 4

# Resultados: Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para determinação de tetrabenazina

### 4.1.

#### Estudos preliminares

A TBZ é uma substância levemente solúvel em água, porém, solúvel em metanol, razão pela qual a solução estoque do padrão ou da amostra de medicamento foi preparada em metanol (100% v/v) e diluída subsequentemente com água para a realização dos estudos em solução. Na estrutura da molécula TBZ, um anel aromático é o principal grupo cromóforo responsável pela absorção de luz. Isso é facilmente verificado pelo perfil de absorção da TBZ cujo máximo ocorre em 283 nm (região característica das bandas E<sub>2</sub> e B do benzeno) como indicado na Figura 13. A absorvidade molar da molécula, encontrado após medições de absorvância (em 283 nm) de soluções de TBZ (entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em 99:1 v/v água/ metanol<sup>21</sup>, foi de  $5,0 \times 10^4$  cm<sup>-1</sup> L mol<sup>-1</sup>.

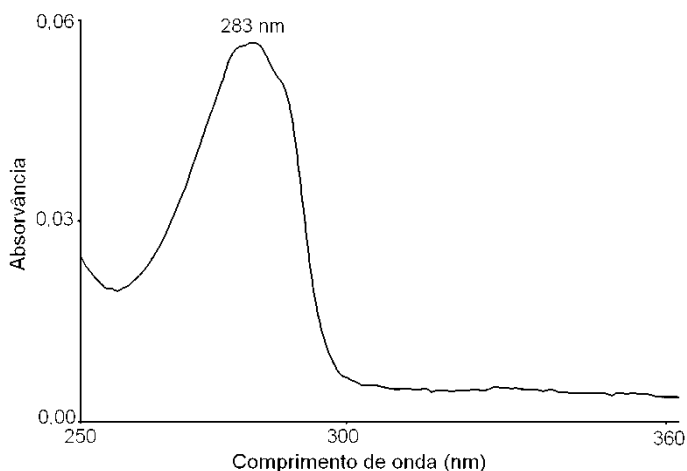


Figura 13 - Espectro de absorção molecular da TBZ ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, em 99:1 v/v água/ metanol)

<sup>21</sup> Utilizando a lei de Beer ( $A = \epsilon bc$ ) foi encontrada a equação  $A = 5033\epsilon Cb + 0,0043$ ; onde A é a absorvância da TBZ., C é a concentração de TBZ (mol L<sup>-1</sup>) e b é o caminho óptico da cubeta utilizada para as medições (1 cm).

O anel aromático da TBZ faz parte de um sistema de anéis que lhe dá uma relativa rigidez. No entanto, os dois grupos metóxi ligados ao anel benzênico e grupo isobutil ligado ao anel que está ligado ao grupo cetona contribuem significativamente para a redução da eficiência quântica fluorescente da TBZ, já que introduzem grande liberdade vibracional que contribuí com o aumento da eficiência do relaxamento não-radiativo de energia. Como consequência, a TBZ apresenta fluorescência natural de intensidade baixa quando em solução aquosa (na concentração de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) como mostrado na Figura 14 e que indica três bandas de excitação (205, 225 e 282 nm) refletindo as três bandas de absorção características do benzeno. A banda de emissão, com máximo em 323 nm, do espectro foi medida em função da excitação em 225 nm.

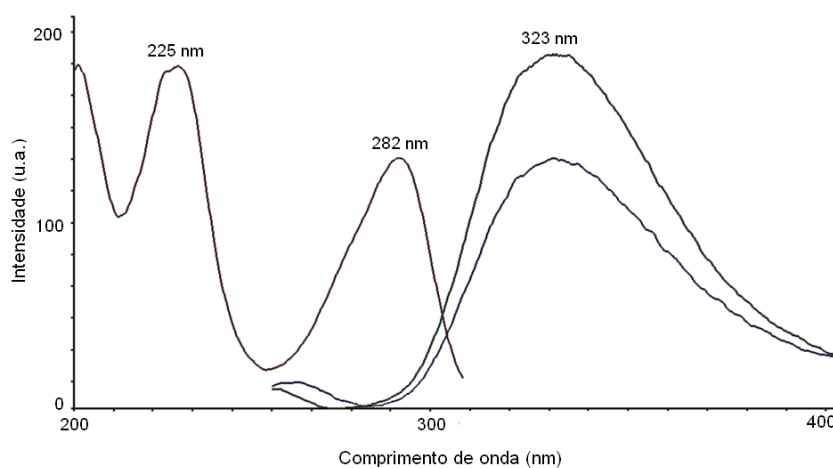


Figura 14 - Espectro de fluorescência da TBZ ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; 99:1 v/v água/ metanol) indicando as bandas de excitação e de emissão.

Como já discutido, a exposição de moléculas orgânicas ao UV pode provocar reações fotoquímicas que resultam em produtos com maior eficiência quântica fluorescente devido à quebra ou ciclização de grupos de cadeias normais ou ainda em função da formação de ligações insaturadas, em decorrência, por exemplo, da desidratação da molécula. Por outro lado, o uso de radiação UV também pode provocar a diminuição do sinal de fundo, por exemplo, pela degradação das impurezas do sistema de solventes utilizados na preparação das soluções, deste modo, contribuindo para a melhoria da razão sinal-ruído. Vale salientar que mesmo trabalhando com solventes de grau analítico ou de pureza adequada para estudos espectroscópicos ou

cromatográficos, muitas vezes um sinal residual é encontrado em muitos lotes de solventes.

Com o intuito de aumentar a fluorescência da TBZ, as soluções do analito, preparadas em soluções com diferentes valores de pH (uma réplica) foram expostas ao UV, no reator fotoquímico I, para que sua fluorescência fosse comparada com aquela medida antes da irradiação. A presença de peróxido de hidrogênio (como possível catalisador de reação ou para promover reações de foto-oxidação) também foi testada. Soluções de TBZ, na concentração de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , foram preparadas diluindo a solução estoque do analito (preparada em metanol) em (i) HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; (ii) NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; (iii) água ultrapura e (iv)  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% (em volume). A fluorescência foi medida antes e após 30 min de exposição ao UV usando o reator fotoquímico (I). Como pode ser observado na

Tabela 3, antes da exposição ao UV, as soluções de TBZ preparadas em HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e em peróxido de hidrogênio 1% v/v apresentam comprimentos de onda de emissão e de excitação similares aos característicos da substância em água (225/323 nm). Já na solução preparada em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ocorreu um deslocamento batocrômico no comprimento de onda máximo de emissão (340 nm) em relação ao observado em água mesmo antes da exposição à luz.

Tabela 3 - Fluorescência das soluções de TBZ ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) antes e após exposição ao UV (30 min)

Meio	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm), sem UV	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm), após UV	$I_{final}/I_{inicial}$
HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	225/ 323	225/ 323	0,37
Água/ metanol (99:1 v/v)	225/ 323	225/ 323	1,56
Água/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 1%	225/ 323	225/ 323	0,75
NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	225/ 340	230/ 354	4,77

Onde  $I_{final}/I_{inicial}$  corresponde a razão entre a intensidade fluorescente obtida após a irradiação no meio especificado ( $I_{final}$ ) a intensidade inicial da TBZ em meio aquoso sem tratamento fotoquímico ( $I_{inicial}$ ).

Após irradiação dessas soluções por 30 min foi observada, para todas as condições testadas, uma mudança na intensidade da fluorescência das soluções em relação ao observado antes da exposição ao UV, conforme indicado nas razões  $I_{final}/I_{inicial}$  da

Tabela 3. O valor de  $I_{final}/I_{inicial}$  é a razão entre o sinal medido após o tratamento fotoquímico nos diferentes meios de reação ( $I_{final}$ ) e o sinal inicial da TBZ quando em 99:1 v/v água/ metanol antes do tratamento fotoquímico ( $I_{inicial}$ ). Apesar de haver um leve aumento do sinal em água após exposição ao UV, um

aumento de sinal muito mais relevante no meio aquoso contendo NaOH foi observado ( $I_{\text{final}} / I_{\text{inicial}} = 4,77$ ). Nessa condição, também foi observado um deslocamento batocrômico de 5 e 31 nm respectivamente no  $\lambda_{\text{exc}}$  e no  $\lambda_{\text{em}}$ , isto é, a fluorescência característica do(s) fotoderivado(s) produzido(s) foi 230/354 nm. A presença de peróxido de hidrogênio e de HCl teve efeito de supressão da fluorescência em relação ao medido da solução aquosa original da TBZ ( $I_{\text{final}} / I_{\text{inicial}} < 1$ ), não se observando modificação nos comprimentos de onda antes e após tratamento com UV. O aumento da fluorescência obtido em meio básico após exposição ao UV direcionou o estudo para a otimização de condições do procedimento de derivatização fotoquímica. Nesse contexto, as duas variáveis estudadas foram o tempo de exposição ao UV e a concentração de NaOH na solução de TBZ. No entanto, antes de dar prosseguimento na otimização, uma avaliação da estabilidade do sinal obtido do(s) fotoproduto(s) da TBZ em meio básico foi realizada. Para tal, o sinal da solução de TBZ, preparada em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , foi monitorado a cada 5 min, num período total de 2 h, após a solução ter sido exposta por 30 min ao UV e deixada por 5 min no escuro para resfriar. Durante o período do estudo não foram observadas mudanças significativas na intensidade da fluorescência, pois houve apenas a variação aleatória do sinal com desvio padrão relativo (DPR) menor que 5% (variação atribuída aos desvios instrumentais do espectrofluorímetro). Da mesma forma, não foram observadas mudanças nos valores de  $\lambda_{\text{exc}}$  e de  $\lambda_{\text{em}}$  característicos do(s) fotoderivado(s). Devido à estabilidade do sinal obtido em meio básico, durante um período considerado satisfatório para a realização das análises por espectrofluorimetria, seguiu-se com a otimização das condições experimentais para a derivatização fotoquímica da TBZ.

#### 4.2.

#### Otimização de parâmetros experimentais da derivatização fotoquímica

Para estudar o comportamento da fluorescência medida de soluções de TBZ em função de diferentes concentrações de NaOH e usando diferentes tempos de irradiação com UV, realizaram-se inicialmente estudos do tipo univariado com soluções de TBZ com concentrações fixas em  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Soluções de TBZ (em triplicata) preparadas em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foram irradiadas entre 0 e 90 min no reator fotoquímico (I). Ensaios do branco também foram realizados. Os resultados indicados na Figura 15 mostram o valor de

fluorescência líquida da TBZ nas diferentes condições, ou seja, a diferença entre a intensidade medida da solução com o analito ( $I_F$ ) e a intensidade medida a partir dos ensaios de branco ( $I_B$ ). Pode-se observar um ganho de sinal significativo a partir de 20 min de irradiação, enquanto que, após 60 min de exposição ao UV ocorre uma pequena queda na intensidade do sinal e posterior estabilização da fluorescência medida, o que indica, juntamente com os resultados do estudo preliminar de estabilidade do sinal (Seção 4.2), o final da reação fotoquímica. Adicionalmente, o sinal estável obtido entre 60 e 90 min indicou que tempos mais longos de exposição ao UV não acarretam em fotodegradação do(s) fotoproduto(s) finais do processo.

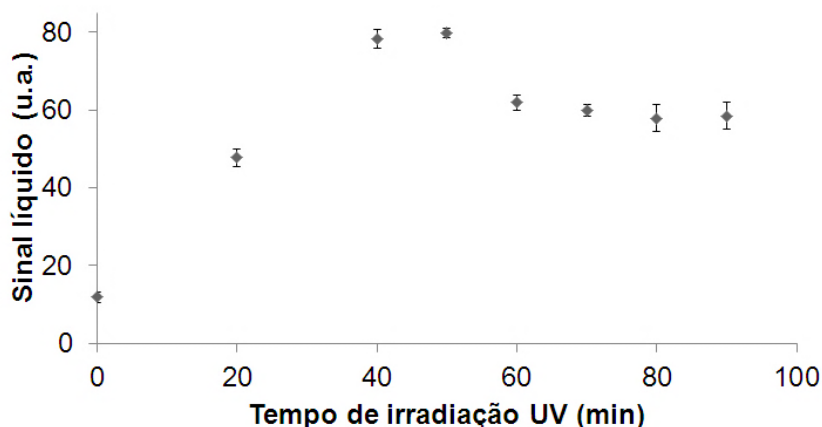


Figura 15 - Efeito do tempo de irradiação sobre a fluorescência de soluções de TBZ ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Um segundo estudo univariado foi realizado com o tempo de irradiação fixo em 50 min de modo a se verificar o efeito da variação do sinal medido das soluções de TBZ ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da variação da concentração de NaOH (faixa entre 0,0 e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). O estudo foi realizado em triplicata e com os respectivos ensaios de branco. Como pode ser observado na Figura 16, um aumento de sinal de mais de duas vezes foi observado para as soluções de TBZ preparadas em soluções de NaOH de concentração final entre 0,25 e  $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ . Esse gráfico indicou uma excelente robustez para esse parâmetro e uma queda relevante de fluorescência para soluções mais concentradas.

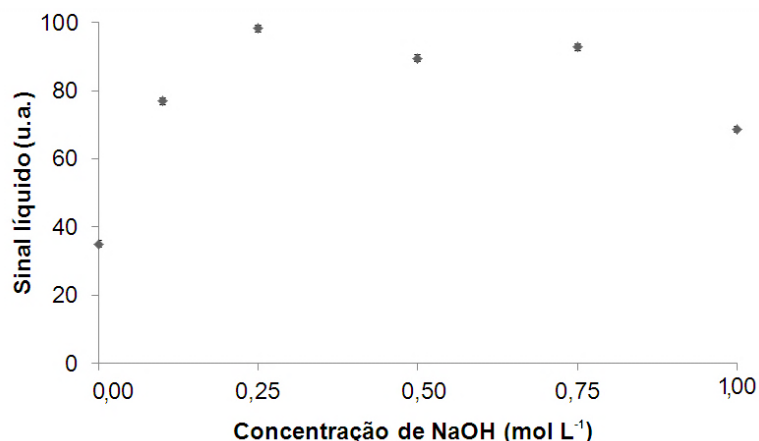


Figura 16 - Efeito da concentração de NaOH sobre a fluorescência de soluções de TBZ ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) irradiadas por 50 min

Embora os estudos univariados permitam conhecer o comportamento do sistema, na maioria das vezes, eles não são suficientes para obter a condição ótima final das variáveis experimentais, que neste caso são o tempo de irradiação e a concentração de NaOH, já que não permitem avaliar a existência de possíveis interações entre essas duas variáveis. Sem o conhecimento da relevância das interações, uma falsa condição ótima pode ser alcançada ao invés da condição ótima efetiva. Dessa forma, realizou-se um estudo multivariado preliminar do tipo composto central para verificar a região de maior aumento de fluorescência da TBZ após fotoderivação. Os pontos experimentais para o planejamento foram escolhidos utilizando a faixa de concentração de NaOH e tempo de UV onde foi observado maior aumento da fluorescência da TBZ nos experimentos univariados, conforme indicado no Anexo C. A partir destes resultados de experimentos multivariados, especificamente após analisar o diagrama de contorno, foi observado um maior aumento de fluorescência na faixa de concentração de 0,3 a 0,6 mol L<sup>-1</sup> de NaOH e na faixa de tempo de exposição ao UV de 50 a 70 min. Utilizando estes novos intervalos de tempo e concentração de NaOH, foi realizado o CCD final para a otimização das variáveis de fotoderivação, utilizando os valores para cada variável descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Pontos experimentais do CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica (concentração de NaOH e tempo de UV) da TBZ

Parâmetro / Valores codificados	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Concentração de NaOH (mol L <sup>-1</sup> )	0,31	0,35	0,45	0,50	0,59
Tempo de UV (min)	46	50	60	70	74

Os valores escolhidos em cada combinação de variáveis para a realização do planejamento são mostrados em função dos valores codificados do planejamento. O experimento em triplicata foi realizado no ponto central do planejamento com apenas uma réplica nos demais pontos e as medições de sinal foram feitas em 230/354 nm. A escolha da ordem das soluções a serem analisadas foi feita de modo aleatório. Os resultados do experimento podem ser visualizados na Tabela 5. A partir dos resultados de intensidade de fluorescência obtidos, foram avaliados os efeitos relativos de cada um dos fatores e a relevância das interações entre os dois fatores mediante a utilização do Software Estatística (Versão 6,0; Statsoft) como indicado na Tabela 6.

Tabela 5 - Resultados do CCD realizado para otimizar as variáveis experimentais (tempo de UV e concentração de NaOH) para a derivatização fotoquímica da TBZ

	Concentração de NaOH, C, (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de UV, t (min)	Intensidade (u.a.)
1	0,35	50	62,53
2	0,35	70	62,78
3	0,55	50	62,77
4	0,55	70	65,01
5	0,45	46	59,8
6	0,45	74	70,45
7	0,31	60	68,56
8	0,59	60	69,75
9 - 11	0,45	60	77,17; 76,57, 75,32,

Ordem dos experimentos: 11, 10, 7, 1, 6, 9, 3, 4, 8,2, 5

O gráfico de Pareto (Figura 17a) apontou grande influência dos fatores quadráticos tanto da concentração de NaOH ( $C^2$ ) quanto do tempo de exposição ao UV ( $t^2$ ) na resposta. Esse efeito é refletido nas curvaturas do gráfico de superfície (Figura 17b) estimado pelo software com base nos resultados experimentais. Não foi observada relevância da interação entre os fatores considerando as faixas de concentração de NaOH e tempo de reação estudadas. O Gráfico de Pareto mostra também um efeito linear relevante da varável tempo de irradiação (t).

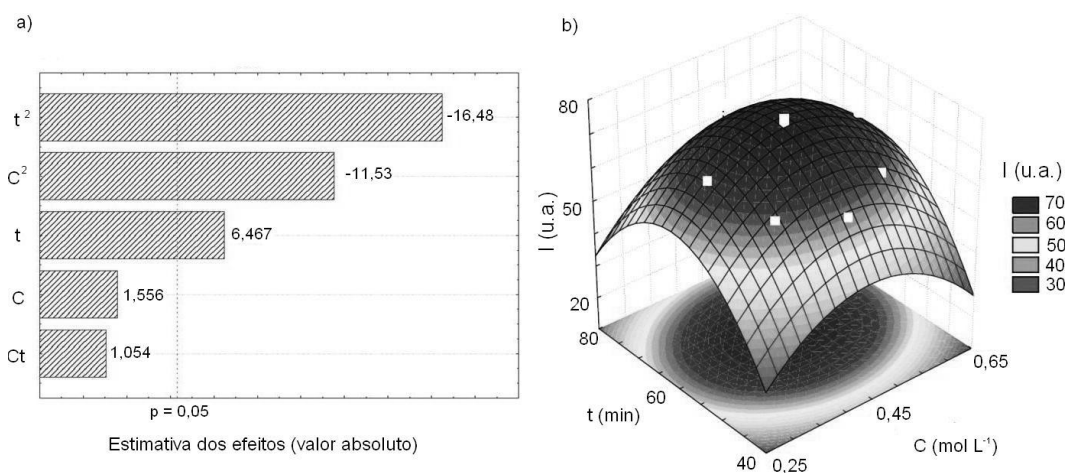


Figura 17 - a) Gráfico de Pareto e b) superfície de resposta dos resultados do CCD para otimização das variáveis de fotoderivação da TBZ, onde  $I$  é intensidade,  $t$  é tempo de UV e  $C$  é concentração de NaOH.

O modelo matemático que explica o formato da superfície de resposta é descrito na Equação 19. A resolução da equação, pela obtenção das derivadas parciais de cada variável, apontou as condições ótimas para fotoderivatização que foram 60 min de irradiação com UV de solução de TBZ preparada em NaOH de 0,45 mol L<sup>-1</sup>.

$$I = 1,0C - 9,2C^2 + 4,3t - 13t^2 + 0,99 Ct; R^2 = 0,86 \quad (19)$$

Onde  $I$  é a intensidade do sinal;  $C$  é a concentração de NaOH e  $t$  é o tempo de reação. Vale salientar a análise de variância dos dados (Tabela 6) indicaram que não houve falta de ajuste significativo do modelo ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ), com isso, a Equação 19 explica até 99,53% da variância do modelo.

Após a otimização dos parâmetros experimentais o ganho de sinal obtido após fotoderivatização química foi de três vezes, como pode ser observado na Figura 18a que mostra o aumento de fluorescência medida de uma solução de TBZ (na concentração de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) antes e após fotoderivatização química. É importante salientar que houve uma diminuição do sinal de branco (Figura 18b) da ordem duas vezes o que contribuiu para melhorar a capacidade de detecção do analito.



Tabela 6 - Análise de variância dos resultados de otimização, pelo planejamento CCD, das variáveis experimentais para a otimização da derivatização fotoquímica da TBZ.

Fator	SQ	GI	MQ	F	P
C	2,156	1	2,156	2,42	0,2601
C <sup>2</sup>	118,4	1	119,48	132,8	0,007441
T	37,28	1	37,27	41,84	0,023075
t <sup>2</sup>	241,8	1	241,8	271,43	0,003664
C x t	0,9900	1	0,9900	1,111	0,4023
Falta de ajuste	49,65	3	16,54	18,57	0,05151
Erro puro	1,782	2			
SQ Total	377,2	10			
% de variação explicada	86,77%				
% máximo de variação explicável*	99,53%				

SQ = soma quadrática, gl = graus de liberdade; MQ = media quadrática . \*%<sub>max</sub> = (SQ<sub>Total</sub> - SQ<sub>erro puro</sub>) / SQ<sub>total</sub>.

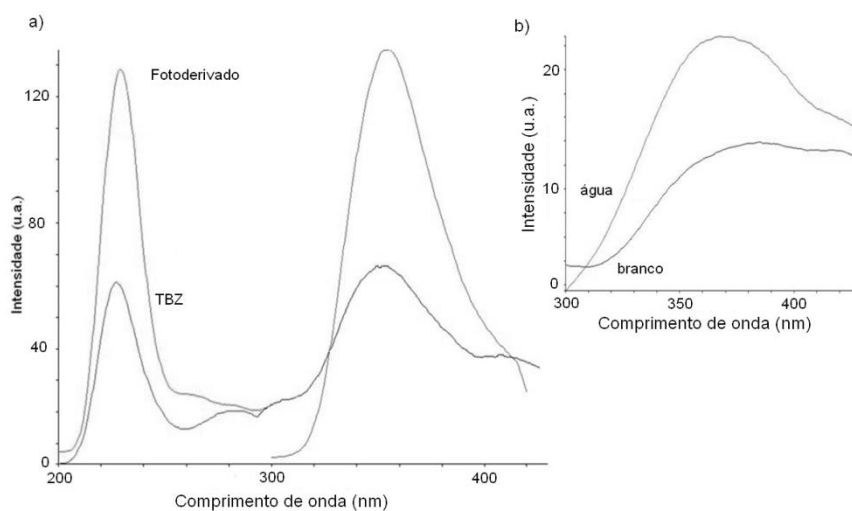


Figura 18 - Espectros de emissão e excitação: a) TBZ ( $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) e fotoderivado e b) brancos antes e após a fotoderivatização

Assim, todos os experimentos realizados a partir desse ponto do trabalho visando a determinação da TBZ foram realizados com as condições indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Resumo das condições experimentais para derivatização indireta da após derivatização fotoquímica

Parâmetro	Condição otimizada
Meio de reação	NaOH 0,45 mol L <sup>-1</sup>
Tempo de irradiação UV	60 min
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	230/ 354 nm
Velocidade de varredura	1500 nm min <sup>-1</sup>
Bandas espectrais de passagem	15/ 15 nm

### 4.3. Estabilidade do fotoderivado e mecanismo de fotoderivatização

Para verificar a estabilidade do(s) fotoderivado(s) obtidos nas condições otimizadas, a fluorescência de uma solução de TBZ ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi monitorada após a derivatização fotoquímica. Para tal, as medições de fluorescência foram feitas em intervalos de 5 min, ao longo de 2 h, mantendo a solução no compartimento de amostra do espectrofluorímetro, protegido da luz e na temperatura ambiente. Entre cada uma das medições a radiação de excitação era interrompida de modo a não expor a solução continuamente à radiação UV de excitação.

Conforme mostrado na Figura 19, não houve mudanças significativas na intensidade do sinal medido em 230/354 nm, como mostra a variação aleatória de intensidade entre medições com valores de DPR em torno de 2%.

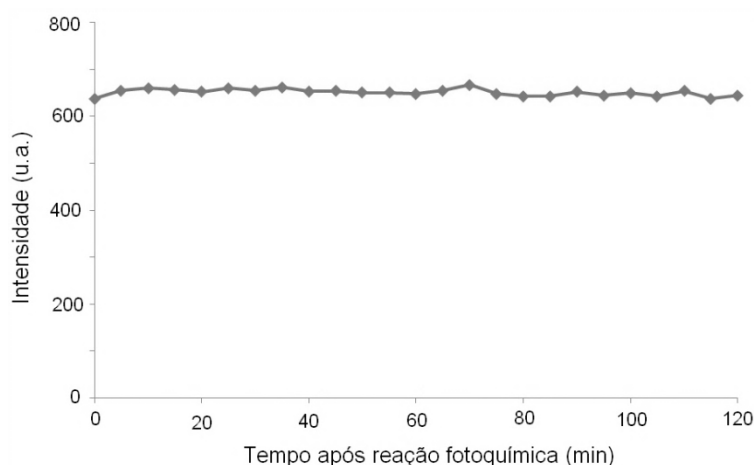


Figura 19 - Fluorescência da TBZ ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) medida sob irradiação descontínua em intervalos de 5 min após derivatização fotoquímica ( $\text{NaOH } 0,45 \text{ mol L}^{-1}$ , 60 min UV)

Experimentos também foram realizados para avaliar os efeitos da exposição da solução de TBZ ao UV, em condições de excitação contínua utilizando a lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro<sup>22</sup>. Para tal, duas soluções foram usadas, a primeira foi uma solução de TBZ submetida ao processo de fotoderivatização, e a segunda, usada para efeito de comparação, foi uma solução de TBZ preparada em água (< 1% metanol) e sem prévia

<sup>22</sup> No caso do Diclofenaco (Arancibia et al., 2000 e 1999), o sinal do analito estabiliza após um tempo de irradiação, em um processo reversível. Assim, se faz necessário avaliar se as medições de fluorescência podem ser feitas no tempo 0, ou após um tempo de estabilização sob irradiação contínua.

exposição ao UV. Após a colocação no compartimento de amostra, ambas as soluções foram excitadas continuamente (em 225 nm para a solução de TBZ em água e em 230 nm para a solução submetida previamente à fotoderivatização) e tiveram suas fluorescências medidas ao longo dos 30 min do experimento.

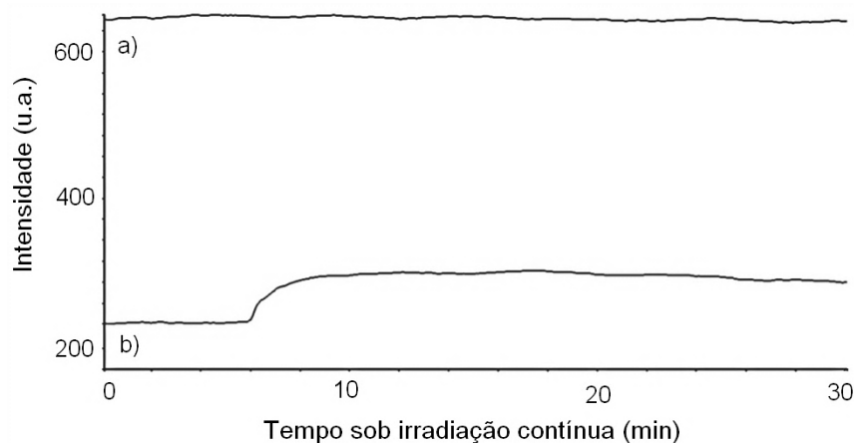


Figura 20 - Fluorescência medida sob excitação contínua (30 min) de: a) fotoderivado (TBZ  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; NaOH 0,45 mol L<sup>-1</sup>; 60 min UV) e b) TBZ ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; 99:1 v/v água/ metanol)

Como pode ser observado na Figura 20, a intensidade da fluorescência (230/354 nm) da solução previamente irradiada com UV permanece constante ao longo dos 30 min de irradiação contínua. Esse resultado confirma a estabilidade do(s) fotoprodutos(s) obtidos no processo de fotoderivatização. Em contraste, a intensidade da fluorescência da solução de TBZ (225/323 nm) sofre uma alteração após 6 min de exposição ao UV no compartimento de amostra resultado que mostra a relativa instabilidade da TBZ sob irradiação da fonte de xenônio. Isso que pode afetar a precisão dos resultados caso se faça a determinação analítica direta utilizando a fluorescência natural desse analito.

Baseado nos resultados experimentais e nas informações presentes na literatura pôde-se propor um mecanismo para a fotoderivatização da TBZ. Como mencionado no início do capítulo, o aumento da fluorescência após derivatização pode ser decorrente do aumento da rigidez da estrutura molecular pela quebra das cadeias carbônicas normais da estrutura. Adicionalmente, a mudança pequena na banda de excitação indica que a estrutura responsável pela absorção de luz (o anel benzênico) é preservado.

A grande estabilidade do(s) fotoproduto(s) formado(s) após a derivatização química nas condições otimizadas e a instabilidade da TBZ sob constante irradiação possibilitaram inferir a ocorrência de uma reação intramolecular de

fotólise da TBZ. A ligação mais lábil da molécula no meio de reação é a ligação – C–C– do carbono da cadeia isobutil na posição  $\alpha$  com respeito ao grupo carbonila. As cetonas cíclicas usualmente sofrem esse tipo de quebra de ligação, conforme o mecanismo de reação de Norrish Tipo I, porém, as cetonas cíclicas, nas quais existe um hidrogênio ligado a um carbono e ao grupo carbonila de uma cadeia alifática (que é o caso dos hidrogênios existentes no grupo isobutil encontrado na TBZ), podem sofrer uma reação de fotólise segundo o mecanismo de Norrish Tipo II (Yates, 1968; Encinas et al., 1980). No caso da TBZ, essas reações típicas do grupo carbonila – por ambos os mecanismos da reação de Norrish – podem levar a diversos produtos de reação, embora nem todos sejam fluorescentes.

O esquema de reação proposto para a formação de produtos mais fluorescentes, a partir da TBZ é mostrado na Figura 21. Numa primeira etapa, a eliminação do grupo isobutil na molécula da TBZ é favorecida mediante a reação de Norrish Tipo II. Esta eliminação contribui grandemente com o aumento da fluorescência por causa da perda da maior cadeia normal substituinte na molécula. O resultado dessa quebra é o produto de 261 Da (Figura 21). Na segunda etapa da derivatização fotoquímica pode ser causada por uma reação de Norrish Tipo I no fotoderivado de 261 Da. Essa etapa resulta na perda do grupo carbonila, com a formação de um produto com 233 Da, que possui uma estrutura bastante rígida.

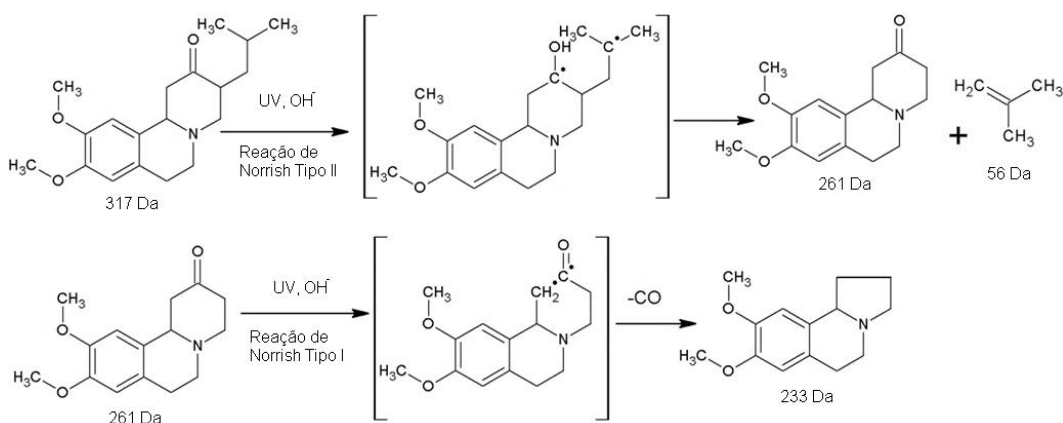


Figura 21 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da TBZ

Na tentativa de identificação dos produtos propostos no mecanismo da Figura 21, soluções de TBZ e do fotoderivado foram preparadas utilizando

derivatização fotoquímica em condições adaptadas (ver Capítulo 3) de modo a se utilizar a Espectrometria de Massas por Desorção utilizando fonte de califórnio em um espectrômetro do tipo tempo-de-voo. ( $^{252}\text{Cf}$ -TOF-PDMS).

Como pode ser observado no espectro de massas da TBZ (Figura 22a) existe um pico molecular característico em 318 ( $317 + 1\text{H m/z}$ ), e um íon em 284 m/z. Por outro lado, na solução do fotoderivado (Figura 22b), este pico de degradação não foi detectado e, mesmo com a baixa definição do espectro de massas obtido (contagens muito baixas) devido à limitação da técnica para determinação de moléculas de massa molar baixa, identificaram-se tanto o pico molecular da TBZ (318 Da), como dois novos picos em 233 e 261 Da, que correspondem à massa molar das moléculas produzidas após a derivatização fotoquímica da TBZ, conforme sugerido no mecanismo de reação da Figura 21.

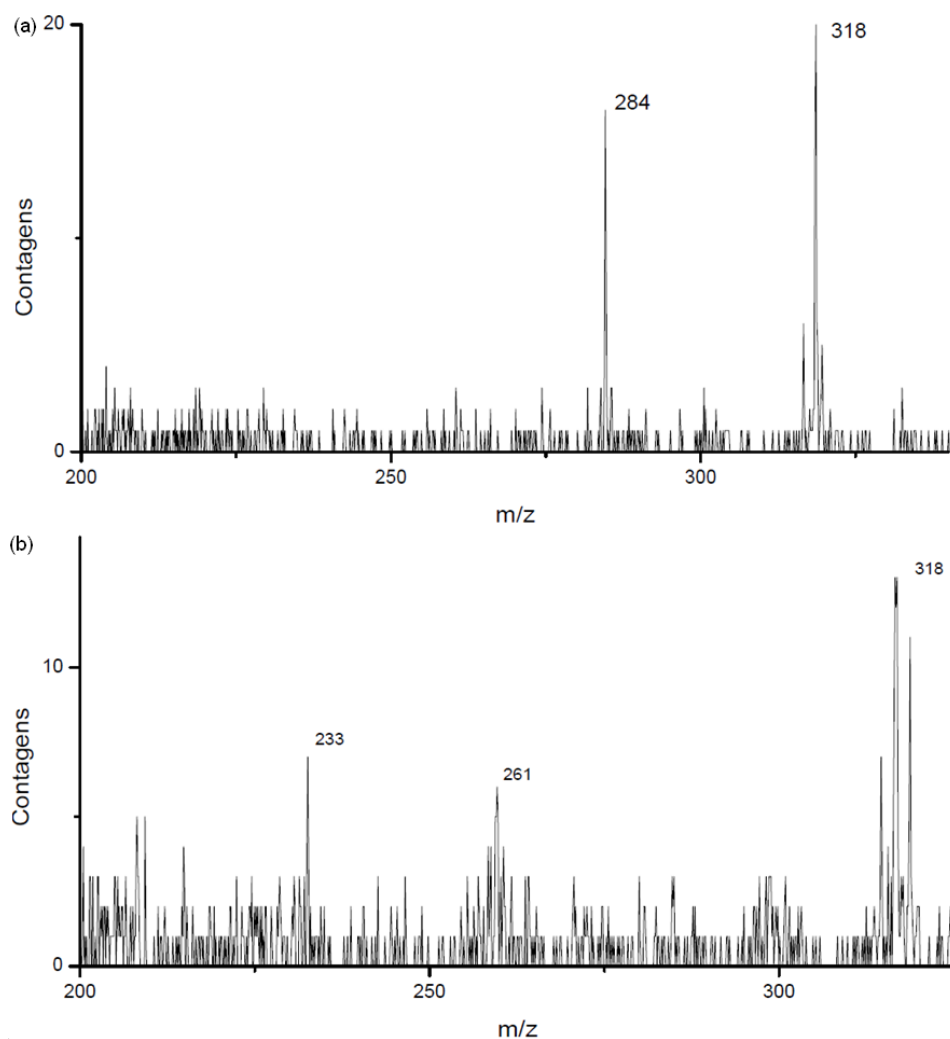


Figura 22 - Espectro de massas de: a) TBZ ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 100% metanol) e b) fotoderivado (TBZ  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; 20:80 Metanol/  $\text{Ca}(\text{OH})_{2\text{sat}}$ ; 60 min UV)

#### 4.4. Parâmetros analíticos de mérito

Dado que a fluorescência do fotoproduto é estável e diretamente proporcional à concentração de TBZ, estudou-se a relação entre o sinal obtido após fotoderivatização química em função da concentração original de TBZ nas soluções. A relação foi avaliada na faixa entre  $5,0 \times 10^{-8}$  e  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de concentração original de TBZ usando triplicata para cada ponto, conforme mostrado na Figura 23.

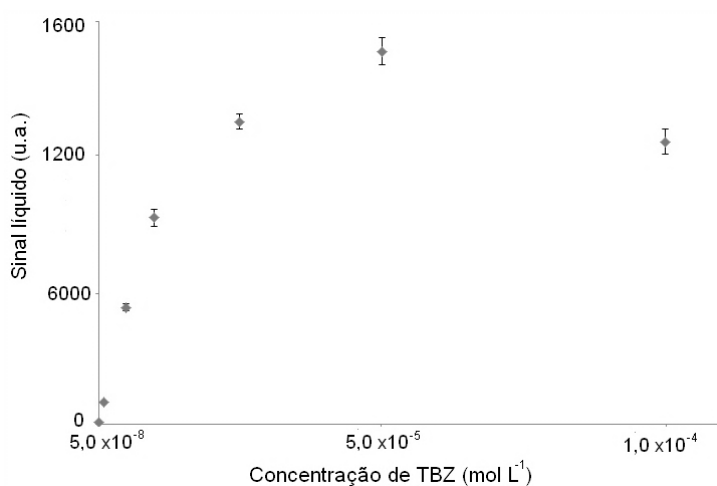


Figura 23 - Relação entre a concentração original de TBZ e a fluorescência (230/354 nm) medida após derivatização fotoquímica (NaOH 0,45 mol L<sup>-1</sup> e 60 min UV).

Como pode ser observado, há um desvio da linearidade do sinal em concentrações de TBZ maiores que  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, que pode ser decorrente de desvios da lei de Beer ou de efeito de filtro interno comum em soluções de concentrações elevadas. Portanto, a faixa de trabalho do método foi determinada para concentrações de até  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de TBZ. Ressalta-se que as soluções de concentração maiores que  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> tiveram que ser medidas utilizando filtros de emissão, pois após a reação fotoquímica a fluorescência dessas soluções ultrapassou a escala do equipamento, de 1000 u.a.

Após a análise de regressão dos dados da curva analítica (Figura 24), a equação da curva correspondente foi  $Y = 7,5 \times 10^8 (\pm 6,9 \times 10^6)X - 18 (\pm 32)$ , onde Y é a intensidade da fluorescência da TBZ, expressa em unidades

arbitrárias, e  $X$  é a concentração da TBZ, expressada em  $\text{mol L}^{-1}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da curva analítica foi de 0,997. O gráfico de resíduos da curva analítica não apontou nenhuma tendência e indica também que há uma correspondência entre o modelo linear proposto que relaciona a concentração de TBZ e o sinal analítico (comportamento homocedástico). Uma análise de regressão mais específica mostrada no Anexo D1, também apontou para um comportamento não tendencioso dos resíduos e indicou que os dados pertencem a uma distribuição normal<sup>23</sup>.

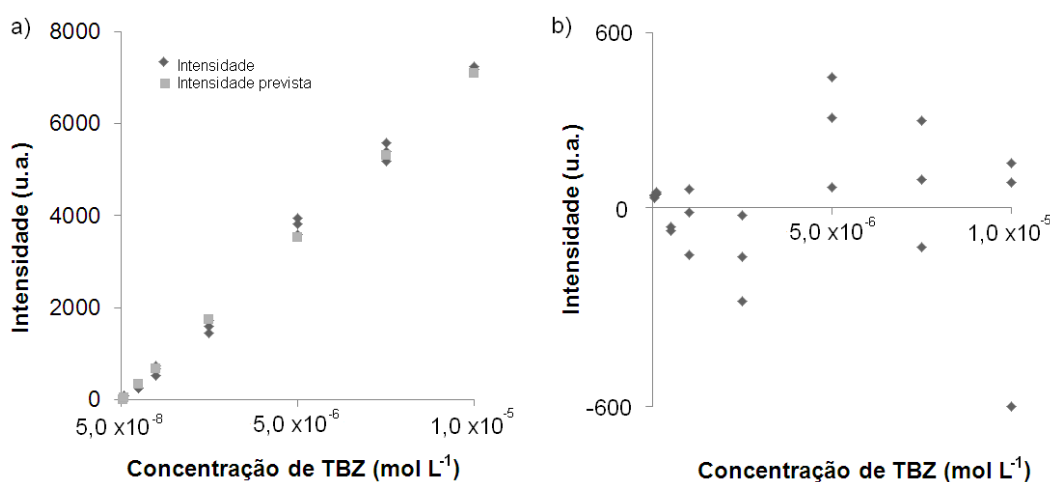


Figura 24 - Gráficos evidenciando: a) faixa linear da curva analítica obtido da medição de fluorescência (230/354 nm) da TBZ (entre  $5 \times 10^{-8}$  e  $1 \times 10^{-5}$   $\text{mol L}^{-1}$ ) após derivatização fotoquímica ( $\text{NaOH } 0,45 \text{ mol L}^{-1}$  e 60 min UV) e b) respectivo gráfico de resíduos.

Para determinar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método espectrofluorimétrico foi utilizado o critério de  $3s_b/m$  e  $10s_b/m$ , respectivamente, onde  $s_b$  corresponde ao desvio padrão de 10 medições da intensidade do ensaio em branco ( $s_b = 3,39$  e média = 18,06), e  $m$  corresponde à sensibilidade da curva analítica ( $7,5 \times 10^8 \text{ u.a. L mol}^{-1}$ ). Os cálculos destes parâmetros apontaram para um valor de  $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para o LD, e  $4,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para o LQ.

A repetibilidade do método foi determinada mediante o coeficiente de variação obtido para as medições de soluções do padrão de TBZ ( $n = 8$ ), preparadas no mesmo dia em três diferentes concentrações dentro da faixa linear do método. A precisão intermediária foi avaliada pela comparação da

<sup>23</sup> Pelo teste de Jarque-Bera, descrito no Anexo C, que serve para testar se uma distribuição é normal (Valor crítico < 9,2 a 90% de confiança).

diferença entre as variâncias (Teste F) obtidas a partir da medição das mesmas soluções após 72 h (mantidas sob refrigeração e protegidas da luz), o que também permitiu avaliar a estabilidade do fotoderivado após a sua preparação. Os valores do teste F ( $F_{\text{crítico}} (u7/u7; 95\% = 3,79)$ ) para as três concentrações testadas,  $5,0 \times 10^{-8}$ ;  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> foram, respectivamente 0,94; 0,80 e 1,1, indicando que em nenhuma das concentrações testadas houve diferença relevante entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise para um nível de 95% de confiança. Os resultados para ambos os parâmetros encontram-se descritos na Tabela 8. No caso da repetibilidade, o coeficiente de variação entre as medições feitas no mesmo dia, na concentração próxima ao LQ, variou em torno de 8%, enquanto que nas demais concentrações testadas, esse valor foi menor que 6%.

Tabela 8 - Repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da TBZ após derivatização fotoquímica

Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	Repetibilidade, CV (%)	Precisão intermediária, CV (%)
$5,0 \times 10^{-8}$	8	8
$5,0 \times 10^{-6}$	5	6
$1,0 \times 10^{-5}$	4	4

A incerteza de medição para a determinação da TBZ foi estimada para três concentrações dentro da faixa linear do método desenvolvido. As fontes de incerteza foram divididas em quatro grupos principais que afetam o sinal analítico: (i) a preparação das soluções; (ii) a repetibilidade; (iii) a precisão intermediária e (iv) a curva analítica, utilizando as equações indicadas no Capítulo 3. A contribuição de cada fonte de incerteza, calculada para as três concentrações dentro da faixa linear encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Incerteza de medição do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da TBZ após derivatização fotoquímica

Fonte de incerteza	Concentração de TBZ (mol L <sup>-1</sup> )		
	$5,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
	Valores da incerteza (mol L <sup>-1</sup> )		
Repetibilidade ( $u_{rp}$ )	$4,4 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-9}$	$5,3 \times 10^{-7}$
Precisão intermediária ( $u_{pi}$ )	$4,6 \times 10^{-9}$	$5,2 \times 10^{-9}$	$6,3 \times 10^{-7}$
Curva analítica ( $u_{curva}$ )	$8,6 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$
Preparação de soluções por ajuste de massas ( $u_{sol}$ )	$6,2 \times 10^{-10}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$
Incerteza combinada ( $u_c$ )	$2,8 \times 10^{-8}$	$7,4 \times 10^{-7}$	$8,4 \times 10^{-7}$
% do valor atribuído ao resultado da medição	21	16	9
Incerteza expandida ( $U_{k=2.01; 95\%}$ )	$5,6 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-6}$



As contribuições de cada fonte de incerteza à incerteza de medição em cada concentração estimada, reportadas em porcentagem, podem ser observadas na Figura 25. O valor estimado para a incerteza de medição na concentração próxima ao LQ do método espectrofluorimétrico foi a mais afetada pela incerteza associada à curva analítica, inclusive ao calcular esta incerteza na faixa de concentração do LQ, valor esse que foi em torno de 17% do valor nominal da incerteza combinada estimada para essa concentração. Já para as outras concentrações, os fatores de precisão intermediária e repetibilidade, que são afetados pelas variações do reator fotoquímico I, são os fatores que mais contribuíram para a incerteza de medição estimada para essas concentrações.

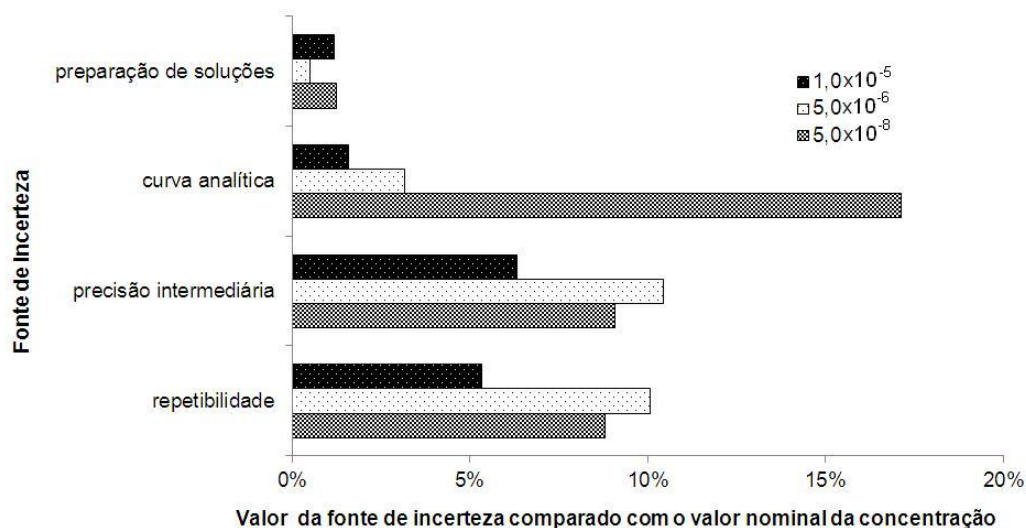


Figura 25 - Contribuição das fontes de incerteza à incerteza de medição do método espectrofluorimétrico para determinar TBZ, nas três concentrações avaliadas ( $5,0 \times 10^{-8}$ ;  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>).

#### 4.5. Aplicação do método

O método desenvolvido para a determinação indireta de TBZ usando a abordagem de derivatização fotoquímica foi aplicado na análise de medicamento Xenazine, que contém a quantidade nominal de 25 mg de TBZ por comprimido. Adicionalmente, para avaliar a viabilidade de aplicação em amostras biológicas, soluções de saliva fortificada em concentração próxima do limite de quantificação do método também foram analisadas.

No caso da análise de TBZ no medicamento, soluções foram preparadas em duas concentrações diferentes (em triplicata) dentro da faixa linear do método proposto, e foram analisadas utilizando tanto o método espectrofluorimétrico proposto quanto por HPLC (Kilbourn, 1997). Os testes de recuperação em concentrações perto do LQ ( $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) somente foram realizadas no método espectrofluorimétrico ( $103 \pm 11\%$ ), já que não foi possível detectar o analito nessa concentração utilizando o método cromatográfico em que somente se quantificou a TBZ utilizando medição da sua fluorescência sem derivatização. As recuperações de TBZ no medicamento obtidas pelos dois métodos foram comparadas e para o nível de 95% de confiança os resultados foram semelhantes ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ ), conforme mostrado na Tabela 10<sup>24</sup>.

Tabela 10 - Recuperação de TBZ em amostra de medicamento.

Concentração de TBZ esperada	$5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$		$5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	
	Método proposto	Método comparativo	Método proposto	Método comparativo
Recuperação	$92 \pm 3\%$	$88 \pm 4\%$	$95 \pm 2\%$	$93 \pm 6\%$
Quantidade de princípio ativo por comprimido (mg)	$23 \pm 0,7$	$22 \pm 0,9$	$24 \pm 0,1$	$23 \pm 1,5$
Valor de t calculado (variâncias diferentes)	1,353		1,794	

$t_{\text{crítico}}$  ( $\nu = 2(3)-2 = 4$ ; 95% de confiança; 2 caudas) = 2,776. O método proposto na tabela é o método espectrofluorimétrico desenvolvido após derivatização fotoquímica da TBZ e o método de comparação é um método de HPLC (Kilbourn, et al 1996).

No caso das amostras de saliva fortificadas, duas abordagens foram realizadas. Primeiro, amostras de saliva (2 mL) foram fortificadas com a quantidade adequada de padrão de TBZ para se conseguir soluções em concentrações finais de  $5,0 \times 10^{-8}$  e  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . A segunda abordagem foi realizada fortificando saliva para obter uma concentração final de  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de TBZ. Posteriormente, esta amostra foi pré-concentrada utilizando extração por fase sólida para obter uma solução em torno de  $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . No caso das soluções preparadas nas concentrações de  $5,0 \times 10^{-8}$  e  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , os resultados da recuperação obtidos foram  $87 \pm 13\%$  e  $90 \pm 3\%$ , respectivamente, enquanto que para a solução de  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  após pré-concentração, o valor da recuperação do analito encontrado foi de  $99 \pm 16\%$ . Ao utilizar a extração em fase sólida, não somente foi conseguida uma recuperação satisfatória do analito, mas também foi possível eliminar os interferentes da matriz de um modo rápido e eficiente.

<sup>24</sup> Os resultados deste trabalho foram publicados por Osorio et al., 2013.