

5

Resultados: desenvolvimento de métodos para determinação indireta da amitriptilina

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os procedimentos realizados para a derivatização fotoquímica da amitriptilina (AMT), uma substância utilizada em medicamentos antidepressivos, e a aplicação desta abordagem para o desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico para a análise de medicamentos com o princípio ativo AMT e um método usando a cromatografia líquida com detecção fluorimétrica para a determinação indireta de AMT em matrizes mais complexas como soro humano.

5.1.

Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para determinação indireta de AMT

5.1.1.

Estudos preliminares

A AMT, comercializada em medicamentos e no padrão analítico na forma de cloridrato, é altamente solúvel em água. Em função disso, as soluções estoque do padrão do analito e as diluições necessárias foram feitas usando água ultrapura.

A AMT é composta por três anéis sendo dois anéis benzênicos e um outro anel de 7 carbonos, além de uma cadeia alifática com uma amina terciária terminal. Os anéis benzênicos são isolados, cada um de um lado do ciclo de 7 membros, mas apesar disso, há uma conjugação mediada pela dupla ligação da cadeia alifática. Contudo, a conjugação entre os orbitais não é perfeita devido a presença do ciclo de 7 membros, que dificulta a deslocalização da nuvem eletrônica. Apesar da estrutura com os anéis ligados propiciarem uma certa rigidez à molécula, a ramificação alifática da AMT causa perdas energéticas por mecanismos não-radiativos diminuindo consideravelmente a capacidade da molécula fluorescer na temperatura ambiente e em solução. Isso é confirmado pela ausência de fluorescência natural da AMT quando em solução aquosa na

temperatura ambiente, como mostrado na Figura 26, onde se tem apenas a fluorescência característica das impurezas da água usada no experimento.

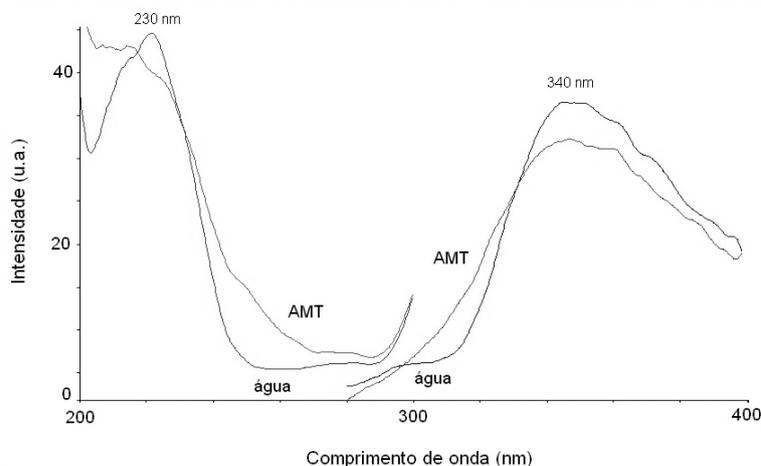


Figura 26 - Espectro de fluorescência obtida da água e da solução aquosa de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

A capacidade da AMT em absorver radiação é fundamentalmente função da presença dos anéis benzênicos isolados como se verifica pelas bandas características E₂ (em 205 nm) e B (em 240 nm) do espectro de absorção molecular da AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 27). Esse espectro também confirma a fraca conjugação efetiva do sistema de anéis já que não foi observado deslocamento batocrômico dos máximos das bandas características do benzeno. Os valores das absorvidades molares da AMT em água nos comprimentos de onda 205 e 240 nm foram calculados pela curva analítica feita com os sinais de absorvância na faixa de concentração de AMT entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se valores iguais a $3,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (205 nm) e $1,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (240 nm).

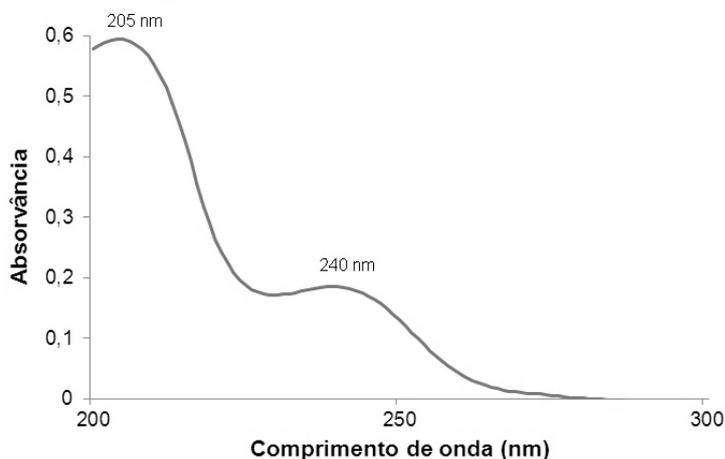


Figura 27 - Espectro de absorção molecular da AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 100% água)

Na molécula da AMT, a eliminação da cadeia alifática poderia gerar estruturas mais rígidas que favoreceriam a observação de fluorescência já que a ausência da cadeia diminuiria grandemente o grau de vibração da molécula. Tal eliminação poderia ser obtida por fotólise como indicado na literatura (Borell, 1977; Albini e Germani, 2010), sendo assim, foram realizados experimentos para avaliar o efeito da exposição da AMT à radiação UV em meios aquosos de diferentes composições. Para tal, realizou-se a exposição ao UV (45 min) de soluções de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas nos seguintes meios reacionais: (i) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (ii) tampão fosfato pH 3 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$); (iii) tampão fosfato (pH 5; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$); (iv) 100% água ultrapura (pH 7); (v) tampão carbonato (pH 10; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$); e (vi) NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. O valor de 45 min para o tempo de irradiação (no reator fotoquímico I) foi escolhido baseado na experiência prévia dos estudos preliminares para a derivatização da TBZ.

Vale salientar que a fluorescência medida da solução de AMT preparada nos meios aquosos mencionados foi similar à observada nas soluções dos respectivos brancos, com espectros de excitação e de emissão similares aos da Figura 26. Em contrapartida, após a exposição ao UV, observou-se a indução de fluorescência em todas as soluções testadas em dois pares de bandas de fluorescência cujos máximos característicos de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ foram em 233/345 nm e em 263/325 nm. As intensidades relativas destes pares, que variaram em função da composição do meio de reação, são mostradas no gráfico de barras da Figura 28.

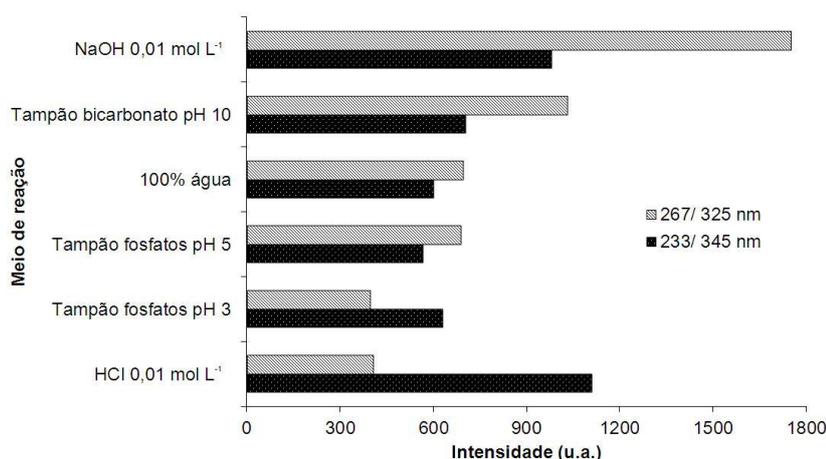


Figura 28 - Fluorescência de soluções de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em distintos meios de reação após exposição ao UV (45 min) e monitorada nos pares de excitação e de emissão de 233/345 nm e 263/325 nm.

Observou-se que após a irradiação com o UV, a tendência do aumento da fluorescência do analito foi mais favorável nas condições mais extremas de acidez (HCl 0,01 mol L⁻¹) e de basicidade (NaOH 0,01 mol L⁻¹). Os espectros de excitação e de emissão do fotoderivado preparados nessas duas condições, após 45 min de irradiação com UV, são apresentados na Figura 29. Para medição da fluorescência destas soluções, que foi bastante intensa, foi necessária à utilização de filtro de atenuação (de 50% de transmitância medida a 632,8 nm²⁵, com um fator 75 vezes de atenuação da fluorescência na faixa entre 300 e 350 nm) na entrada do monocromador de emissão de modo a se evitar a saturação do sinal no detector.

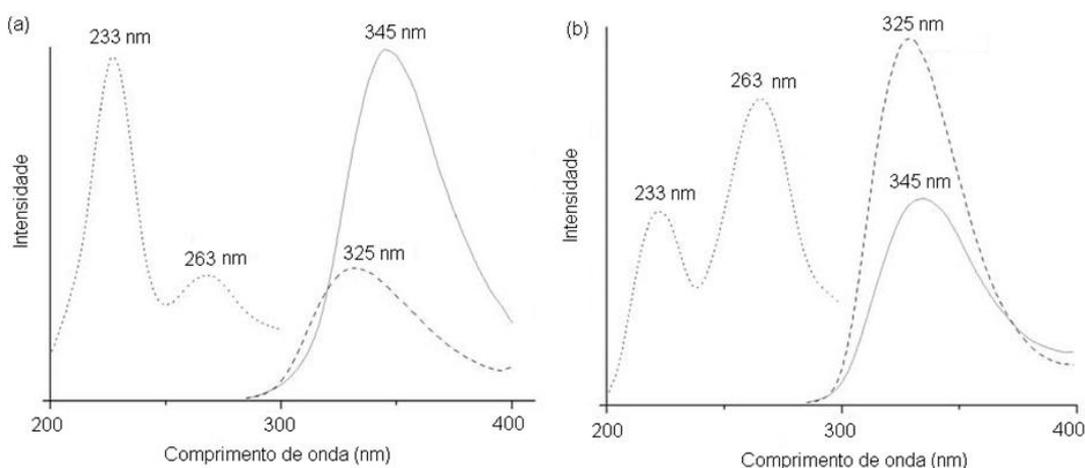


Figura 29 - Espectros de excitação e de emissão de soluções de AMT $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ nos meios reacionais: (a) HCl 0,01 mol L⁻¹ e (b) NaOH 0,01 mol L⁻¹ após 45 min de irradiação com UV.

É importante observar também que em meio alcalino a intensidade do par de bandas em 263/325 nm é maior que o par em 233/345 nm, após a irradiação da solução de AMT por 45 min. Neste caso, o aumento de fluorescência em relação ao da solução não tratada com UV é de mais de 22 vezes. Já em meio ácido, utilizando o mesmo tempo de UV, a formação da fluorescência no par de 233/345 nm foi o mais favorecido após a fotoderivatização da AMT (I_{final}), com amplificação de sinal em quase 35 vezes em relação ao medido antes da

²⁵ Conforme as informações fornecidas pelo fabricante (Newport, EUA)

exposição ao UV (I_{inicial}). Esses fatores de amplificações da fluorescência, mesmo em condições não otimizadas, mostram o potencial da derivatização fotoquímica para a determinação da AMT. Os fatores de amplificação de fluorescência ($I_{\text{final}}/I_{\text{inicial}}$) obtidos nas condições de cada experimento são mostradas na Tabela 11.

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.

<i>Meio de reação</i> /($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$)	$I_{\text{final}} / I_{\text{inicial}}$	
	233/345 nm	263/325 nm
HCl 0,01 mol L ⁻¹	22,17	8,13
Tampão fosfato pH 3	12,60	7,96
Tampão fosfato pH 5	11,30	13,78
100% água	11,99	13,92
Tampão bicarbonato pH 10	14,03	20,58
NaOH 0,01 mol L ⁻¹	19,59	34,95

A estabilidade da fluorescência da solução de AMT exposta ao UV foi estudada pelo monitoramento do sinal ao longo de 120 min (medições feitas a cada 5 min) após a exposição ao UV por 45 min. No intervalo entre cada medição, a solução foi mantida no escuro e na temperatura ambiente. Essa avaliação se faz necessário nesta etapa preliminar para se averiguar se a fluorescência do fotoderivado obtido é estável o suficiente para o desenvolvimento de um método analítico para determinação indireta de AMT após derivatização fotoquímica. O teste de estabilidade foi realizado primeiramente na solução da AMT preparada em NaOH 0,01 mol L⁻¹, acompanhando o sinal em 263/325 nm, que é o $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ característico do(s) fotoproducto(s) que produziu(ram) maior sinal nessa condição. Os resultados apontaram para um decréscimo de fluorescência do fotoderivado de até 25% durante o período do teste, o que indica falta de estabilidade desse(s) produto(s) em meio básico. O mesmo estudo foi realizado em uma solução do fotoderivado da AMT preparada em HCl 0,01 mol L⁻¹, monitorando o sinal em 233/345 nm, que é o $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ característico do(s) fotoproducto(s) que produziu(ram) maior sinal nessa condição. Nesse caso, a intensidade da fluorescência foi estável ao longo dos 120 min do experimento. Os resultados são mostrados na Figura 30. Dessa forma, a fluorescência (233/345 nm) do(s) fotoderivado(s) obtidos em HCl 0,01 mol L⁻¹ permaneceu estável durante o tempo suficiente para permitir seu uso do ponto de vista analítico da determinação de AMT. Assim, foram otimizadas as condições experimentais relacionadas à concentração do HCl na solução de AMT e o tempo de exposição da solução ao UV.

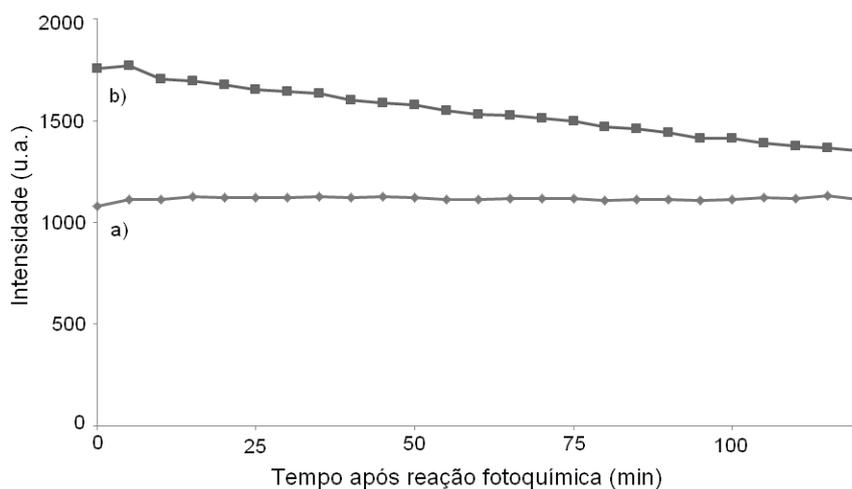


Figura 30 - Fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) monitorada entre 0 e 120 min após derivatização fotoquímica (45 min UV) em a) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (233/345 nm) e b) NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (263/325 nm).

5.1.2. Otimização de parâmetros experimentais para a derivatização fotoquímica

Um estudo univariado para avaliar o comportamento da fluorescência induzida da AMT em função da variação da concentração do ácido (HCl na faixa entre 0 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi realizado. Com 45 min de exposição ao UV, observou-se um crescimento significativo da intensidade da fluorescência da solução de AMT em função do aumento da concentração de HCl até $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O aumento da concentração de HCl para $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ promoveu a supressão da fluorescência de 25%, ao comparar o sinal com o obtido em solução irradiada sem adição de ácido. A supressão se torna mais efetiva em concentrações maiores de HCl na solução (Figura 31).

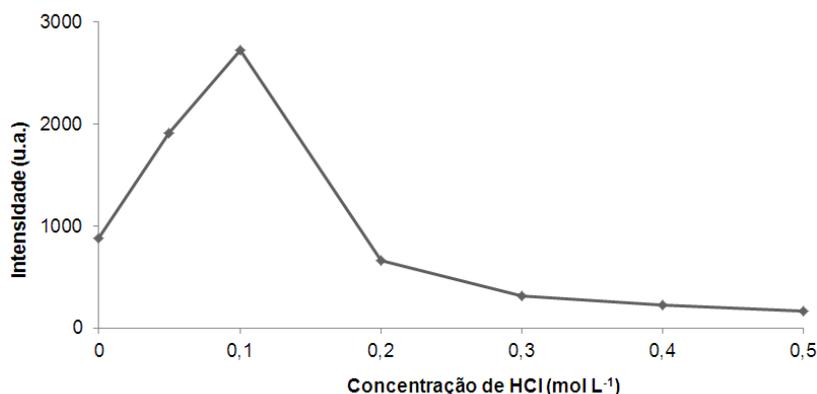


Figura 31 - Efeito da concentração de HCl na fluorescência de soluções aquosas de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas por 45 min

A influência do tempo de exposição ao UV também foi avaliada. Para tal, a fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi medida após expor à irradiação UV soluções de AMT, em intervalos de 5 min até o tempo final de 70 min (Figura 32). Como resultado, verificou-se um perfil de aumento de sinal, aparentemente em duas etapas com sinal máximo e praticamente estável entre 60 e 70 min de exposição ao UV.

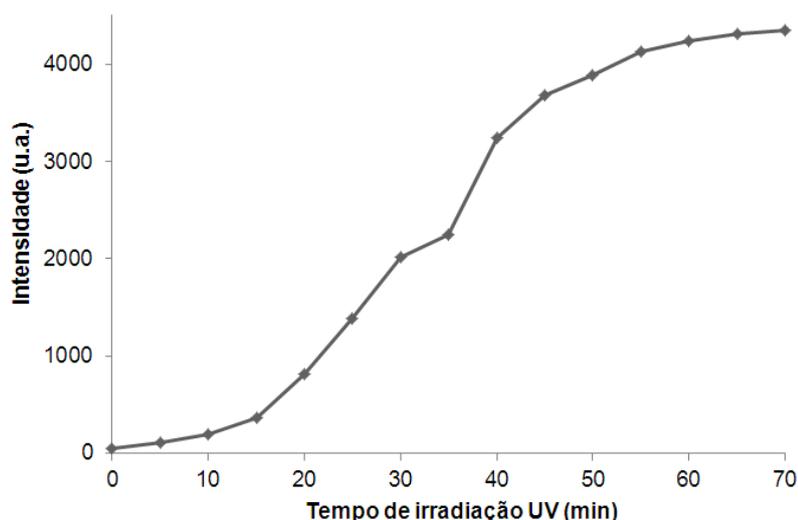


Figura 32 - Efeito do tempo de exposição ao UV na intensidade de fluorescência de soluções de AMT ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em solução aquosa de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Para a otimização das condições de derivatização fotoquímica da AMT usando planejamento experimental, concentrações menores de analito ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram usadas visto que nos estudos preliminares, para a medição de alguns dos sinais na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AMT necessitaram o uso do filtro de atenuação e correção de valores medidos (valores acima de 1000 u.a.). Por causa de defeitos e não homogeneidade dos filtros, o uso destes em ensaios de otimização pode distorcer levemente o perfil de resposta em relação aos sinais medidos sem o uso do filtro de atenuação.

Para avaliar os efeitos das variáveis experimentais, e as possíveis interações, um planejamento experimental preliminar do tipo CCD 2^2 foi realizado utilizando os intervalos de concentração de HCl e de tempo de UV nos quais foram observadas maiores mudanças na fluorescência da AMT nos estudos univariados. Mediante a avaliação do diagrama de contorno deste desenho experimental preliminar (Anexo C), pode ser observada a região onde, ao variar as duas variáveis ao mesmo tempo, efetivamente se observa um maior aumento da fluorescência da AMT. Assim, utilizando essas informações, um outro planejamento experimental foi realizado no intervalo de concentração de HCl entre 0,01 e $0,058 \text{ mol L}^{-1}$ com tempos de exposição ao UV entre 46 e 74 min, conforme os valores indicados na

Tabela 12.

Tabela 12 - Pontos experimentais do CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica (concentração de HCl e tempo de UV) da AMT.

Parâmetro / Valores codificados	-√2	-1	0	+1	+√2
Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	0,009	0,010	0,030	0,050	0,058
Tempo de UV (min)	46	50	60	70	74

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória, conforme apontado pelo software especializado constituindo de um experimento por cada ponto do planejamento, e quatro réplicas no ponto central. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

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.

#	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	Tempo de exposição ao UV (min)	Intensidade do sinal (u.a.)
1	0,058	60	215,04
2	0,010	70	201,39
3	0,030	74	224,51
4	0,030	60	279,37
5	0,009	60	230,93
6	0,030	60	308,47
7	0,050	50	230,06
8	0,010	50	257,54
9	0,030	46	164,61
10	0,030	60	284,86
11	0,050	70	168,56

Avaliando os resultados através da superfície de resposta, o modelo aponta para um máximo das variáveis testadas (valores ótimos ou críticos) em uma concentração de HCl e tempo de irradiação UV próximo ao ponto central do desenho experimental realizado, conforme indicado na Figura 33a. O gráfico de Pareto (Figura 33b) aponta que o fator quadrático do tempo de irradiação (t^2) foi mais significativo para o aumento da fluorescência da AMT. Já o efeito de interação entre o tempo de reação e a concentração de HCl não foi significativo, na faixa experimental testada.

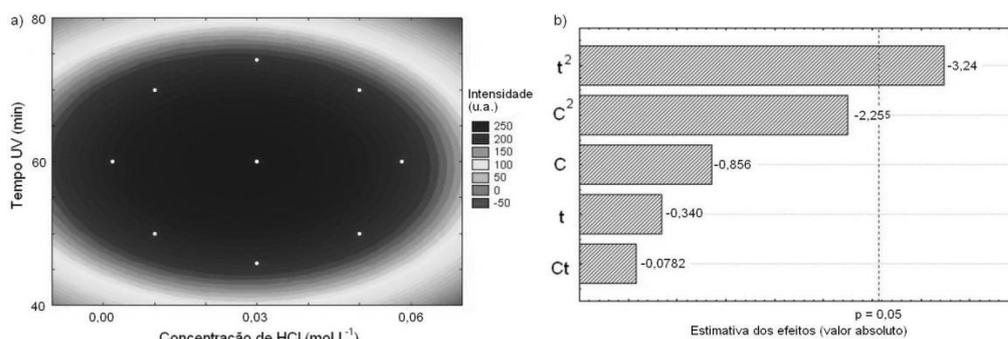


Figura 33 - a) superfície de resposta e b) gráfico de Pareto do CCD realizado para a otimização das variáveis de fotoderivatização da AMT (C: concentração de HCl, mol L⁻¹; t: tempo de UV, min).

A equação do modelo matemático que descreve os resultados do desenho experimental realizado para a otimização das variáveis para a determinação indireta da AMT (Equação 21), onde I é a intensidade da fluorescência da AMT, C é a concentração de HCl em mol L⁻¹ e t é o tempo de irradiação UV, em min.

$$I = -20,7C - 64,8C^2 - 8,2t - 93,3t^2 - 2,67 Ct; \quad R^2 = 0,73 \quad (21)$$

A análise de variância desse modelo não apontou para uma falta de ajuste significativo ($F_{\text{calculado}} = 7,32 < F_{\text{crítico}} = 9,55$) e explica até 98% da variância dos dados, segundo o mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de variância dos resultados do planejamento experimental CCD para a otimização das variáveis de derivatização fotoquímica da AMT.

Fator	SQ	GI	MQ	F	P
C	856,60	1	856,60	3,50911	0,201899
C ²	5935,53	1	5935,53	24,31508	0,038752
T	135,62	1	135,62	0,55557	0,533744
T ²	12280,26	1	12280,26	50,30644	0,019304
C x t	7,16	1	7,16	0,02931	0,879813
Falta de ajuste	5360,79	3	1786,93	7,32021	0,122555
Erro puro	488,22	2	244,11		
SQ total	21291,49	10			
% variância explicada					73%
% máximo de variância explicada*					98%

Onde C é a concentração de HCl, t é o tempo de irradiação, SQ = soma quadrática, gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática. *% max = (SQ_{Total} - SQ_{Erro puro}) / SQ_{total}

A resolução da Equação 21 apontou para valores críticos (ótimos) de: 0,027 mol L⁻¹ (na prática 0,03 mol L⁻¹) para a concentração de HCl na solução de AMT e 60 min para o tempo de exposição ao UV. Um experimento de derivatização da AMT (1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; n = 3) na condição otimizada foi realizado para confirmação dos resultados apontados para os valores críticos.

Um espectro de excitação e de emissão da fluorescência medida da solução de AMT, antes e após aplicação das condições otimizadas de derivatização fotoquímica, são apresentados na Figura 34. Observa-se o incremento de 5,6 vezes da fluorescência medida da solução de AMT após aplicação do procedimento de derivatização fotoquímica. É importante salientar que a fluorescência medida da solução de AMT antes da exposição ao UV é igual ao perfil do ensaio do branco. Adicionalmente, observou-se um perfil de fluorescência do ensaio de branco similar antes e após a exposição ao UV.

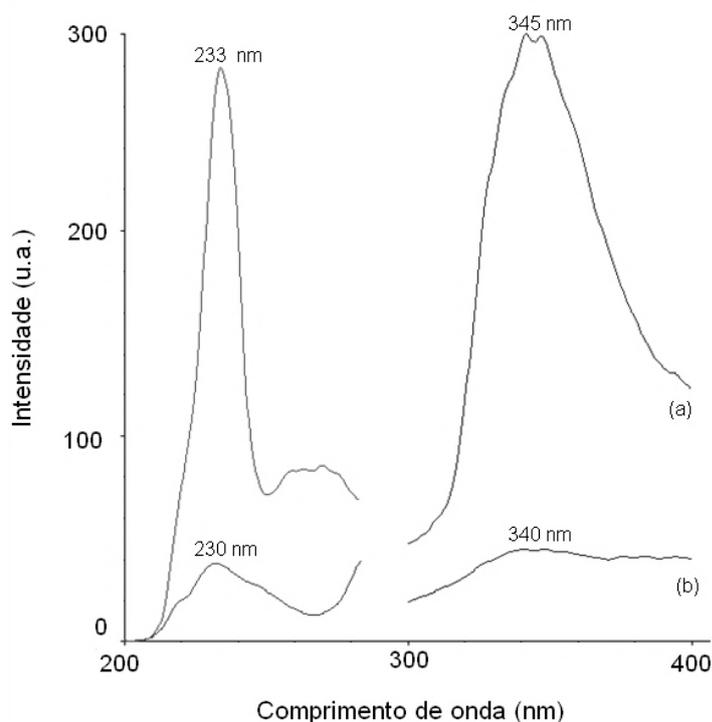


Figura 34 - Espectro de excitação e de emissão: a) fotoderivado (AMT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min de irradiação UV) e b) AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% água).

Um resumo das condições experimentais otimizadas para a determinação indireta da AMT por espectrofotometria de fluorescência por derivatização fotoquímica é apresentado na Tabela 15. Estas condições experimentais foram utilizadas para as etapas de validação e aplicação do método.

Tabela 15 - Resumo das condições experimentais para a determinação indireta da fluorescência da AMT após a derivatização fotoquímica

Parâmetro	Condição otimizada
Meio de reação (solvente)	HCl 0,03 mol L ⁻¹
Tempo de irradiação UV	60 min
Comprimentos de onda de excitação/emissão	233/345 nm
Velocidade de varredura	1500 nm min ⁻¹
Bandas espectrais de passagem (excitação/emissão)	15/15 nm

5.1.3.

Estudo de estabilidade de fluorescência e mecanismo da fotoderivatização

A estabilidade da fluorescência medida da solução de AMT após a derivatização fotoquímica em condições otimizadas foi avaliada medindo (i) a intensidade da fluorescência sob irradiação incidente contínua (30 min) da fonte de excitação de xenônio do espectrofluorímetro e (ii) a intensidade da fluorescência medida em intervalos de 5 min até 90 min de uma solução após ser submetida ao procedimento de derivatização fotoquímica.

A estabilidade da fluorescência em condições de exposição contínua à radiação de excitação do espectrofluorímetro foi realizada em soluções aquosas de AMT, sendo uma delas preparada em HCl 0,03 mol L⁻¹ e previamente submetida ao procedimento de derivatização fotoquímica e a outra, preparada em água ultrapura e não exposta ao UV previamente à sua colocação no compartimento de amostra do espectrofluorímetro. Na Figura 35 observou-se que a fluorescência de ambas as soluções permaneceu estável durante o período do experimento. Portanto, para a determinação indireta da AMT não há influência do tempo de início da medição após derivatização fotoquímica nem fotoderivatização da solução no compartimento de amostra. No caso da solução não exposta previamente ao UV, verificou-se que a radiância da fonte de excitação e as condições da solução não foram suficientes para desencadear reação fotoquímica relevante na solução de AMT.

A estabilidade do sinal analítico é um fator importante nos procedimentos de derivatização fotoquímica com objetivos analíticos. A medição da fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) após a derivatização fotoquímica (HCl 0,03 mol L⁻¹, 60 min de UV) foi realizada em intervalos de 5 min até completar 90 min. Nos intervalos entre medições, a solução foi mantida em um compartimento fechado e protegido da luz e a lâmpada de xenônio foi desligada. Nesse caso, não foi observada mudança significativa na fluorescência do fotoderivado (Figura 36).

A variação de sinal foi aleatória e o coeficiente de variação obtido das medições ao longo dos 90 min foi de 1,2%.

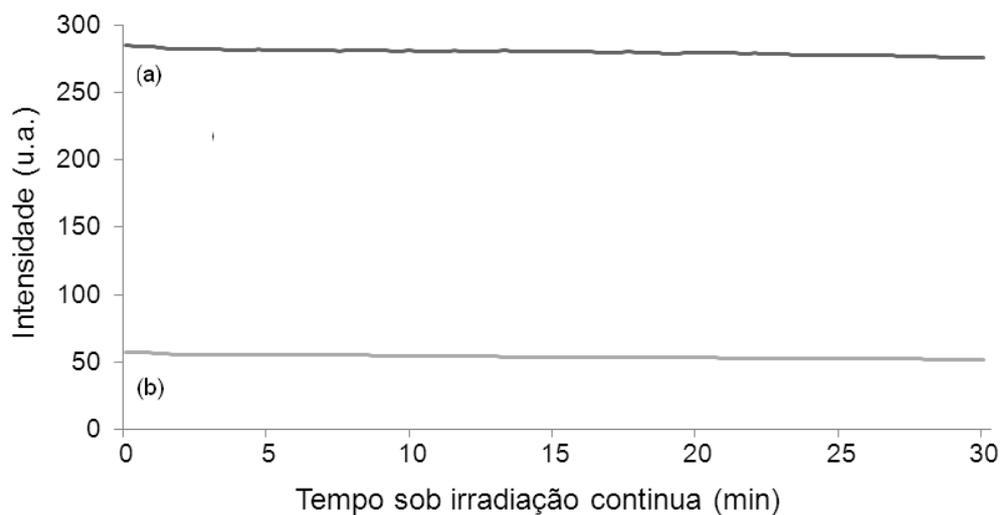


Figura 35 - Avaliação da estabilidade: a) fotoderivado ($\text{AMT } 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{HCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min UV) e b) AMT ($\text{AMT } 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100 % água) sob irradiação incidente contínua.

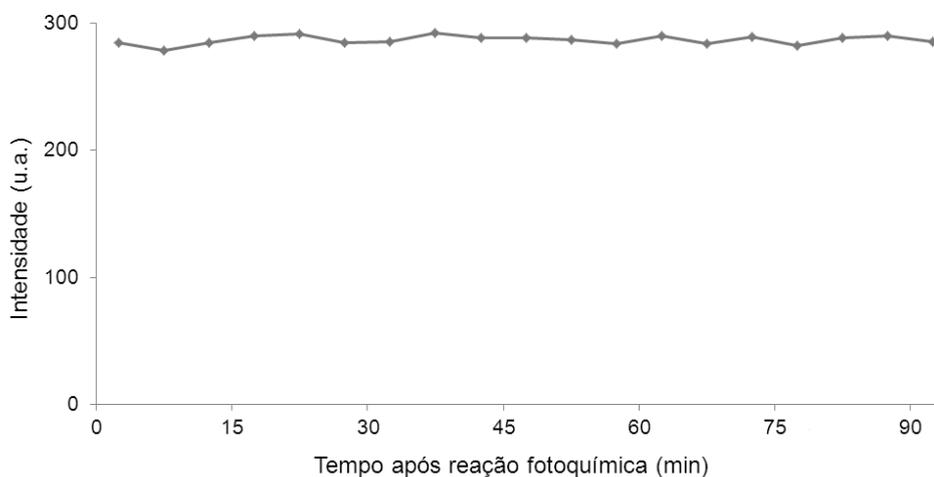


Figura 36 - Avaliação da estabilidade da fluorescência da AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em condições otimizadas de derivatização ($\text{HCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$; 60 min UV), medida sob irradiação descontínua, em intervalos de 5 min após a reação fotoquímica.

Para a identificação do mecanismo de reação e para propor a estrutura dos fotoderivados sintetizados na derivatização fotoquímica da AMT foram consideradas: (i) as condições utilizadas para promover a reação e (ii) a

evidência do aumento da intensidade de fluorescência obtido experimentalmente com a derivatização.

No primeiro caso, a revisão bibliográfica indica que o mecanismo de reação mais favorável para geração de produtos fluorescentes, utilizando lâmpadas de mercúrio de baixa pressão e meio aquoso, é a fotólise. No segundo caso, pelo aumento de fluorescência, afirma-se que os fotoprodutos possuem maior eficiência quântica que a AMT, propriedade essa que, em moléculas orgânicas é causada por uma maior rigidez estrutural ou uma maior conjugação de elétrons π . Dessa forma, avaliando a reação de fotólise e a formação de fotoprodutos com maior rigidez estrutural e/ou conjugação de elétrons π , o esquema de reação para a derivatização fotoquímica da AMT é proposto na Figura 37.

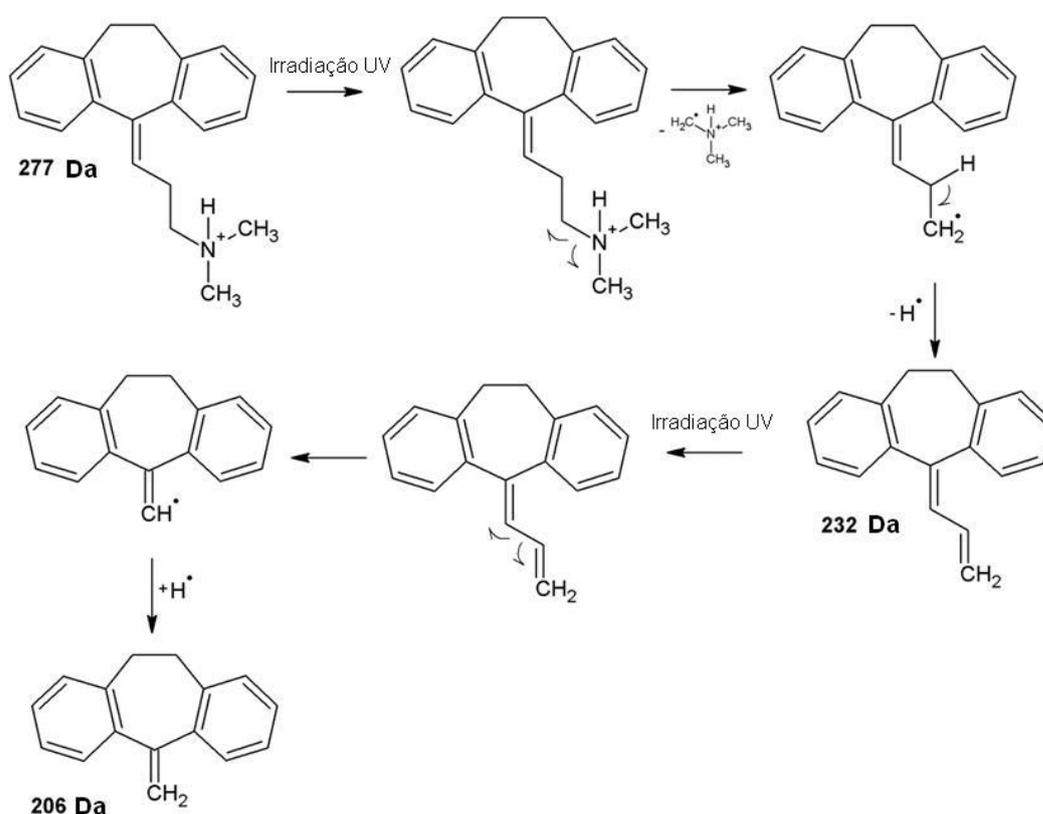


Figura 37 - Esquema de reação proposto para a fotoderivatização da AMT em condições otimizadas (HCl $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ irradiada por 60 min).

Estima-se que a formação dos fotoprodutos ocorra em duas etapas: (i) a eliminação do grupo amino da molécula da AMT (277 Da), para gerar uma molécula com uma cadeia alifática (236 Da), cujas insaturações se conjugam com resto do sistema aromático da molécula e (ii) outra reação na cadeia

alifática insaturada do produto de 232 Da, causando outra fotólise na molécula e a formação do fotoderivado com 206 Da. Embora esta rota não seja a única para formação de produtos de reação, as moléculas apontadas no mecanismo, com de 232 ou 206 Da, possuem maior rigidez estrutural e alta conjugação de elétrons π , responsáveis pelo aumento de fluorescência observado nas medições espectrofluorimétricas realizadas após a derivatização fotoquímica da AMT.

Na tentativa de identificar estes fotoprodutos, análises foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). Soluções de $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de AMT ($9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em acetonitrila e irradiadas em intervalos de 0 a 30 min, para monitorar e identificar os fotoprodutos e a cinética de reação²⁶. Na Figura 38 é apresentado o cromatograma de uma solução de AMT irradiada por 30 min. Observa-se que no tempo de retenção de 21,96 min, aparece o íon molecular da AMT (m/z 277 Da) e nos tempos de retenção de 18,81 e 18,08 min aparecem, respectivamente, dois fotoderivados de 232 e 206 Da, massas molares essas atribuídas aos fotoprodutos propostos no mecanismo de fotoderivatização da AMT anteriormente descrito.

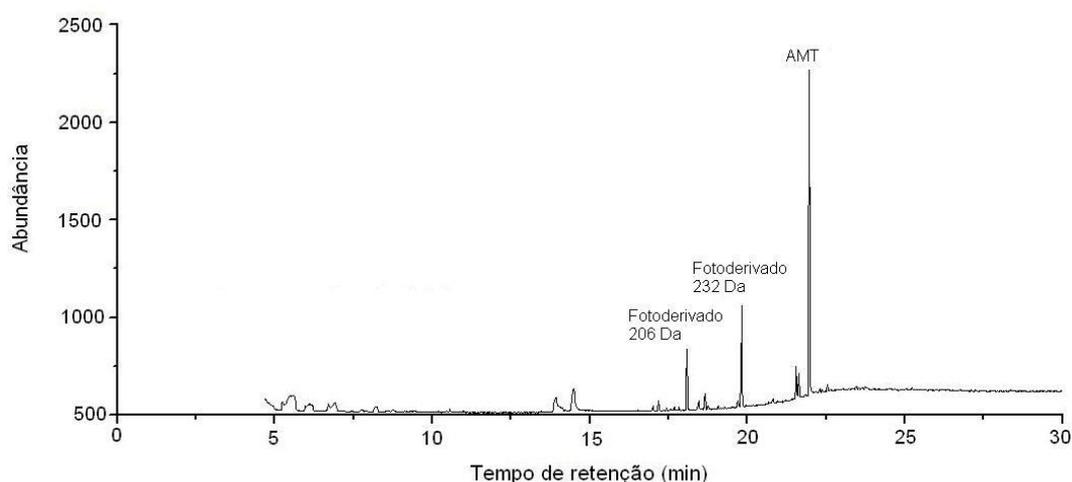


Figura 38 - Cromatograma de íons totais de uma solução de AMT ($9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% acetonitrila) após 30 min de UV.

²⁶ Devido à incompatibilidade da técnica de GC-MS com o meio aquoso, optou-se por realizar a reação fotoquímica da AMT em 100% de acetonitrila, comparando previamente por espectrofluorimetria a eficiência da reação (intensidade) e os comprimentos de onda, similares em ambos solventes.

O espectro de massas de cada íon do cromatograma anterior se encontram na Figura 39. No espectro que corresponde a AMT (Figura 39a) pode-se observar um pico em m/z 58 Da, já caracterizado anteriormente em outros trabalhos (Rani *et al.*, 2011; Papoutsis *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2011). Nos outros dois espectros da Figura 39, os íons com maior abundância relativa são, respectivamente, os íons de 206 e 232 Da, característicos das estruturas propostas no mecanismo reacional.

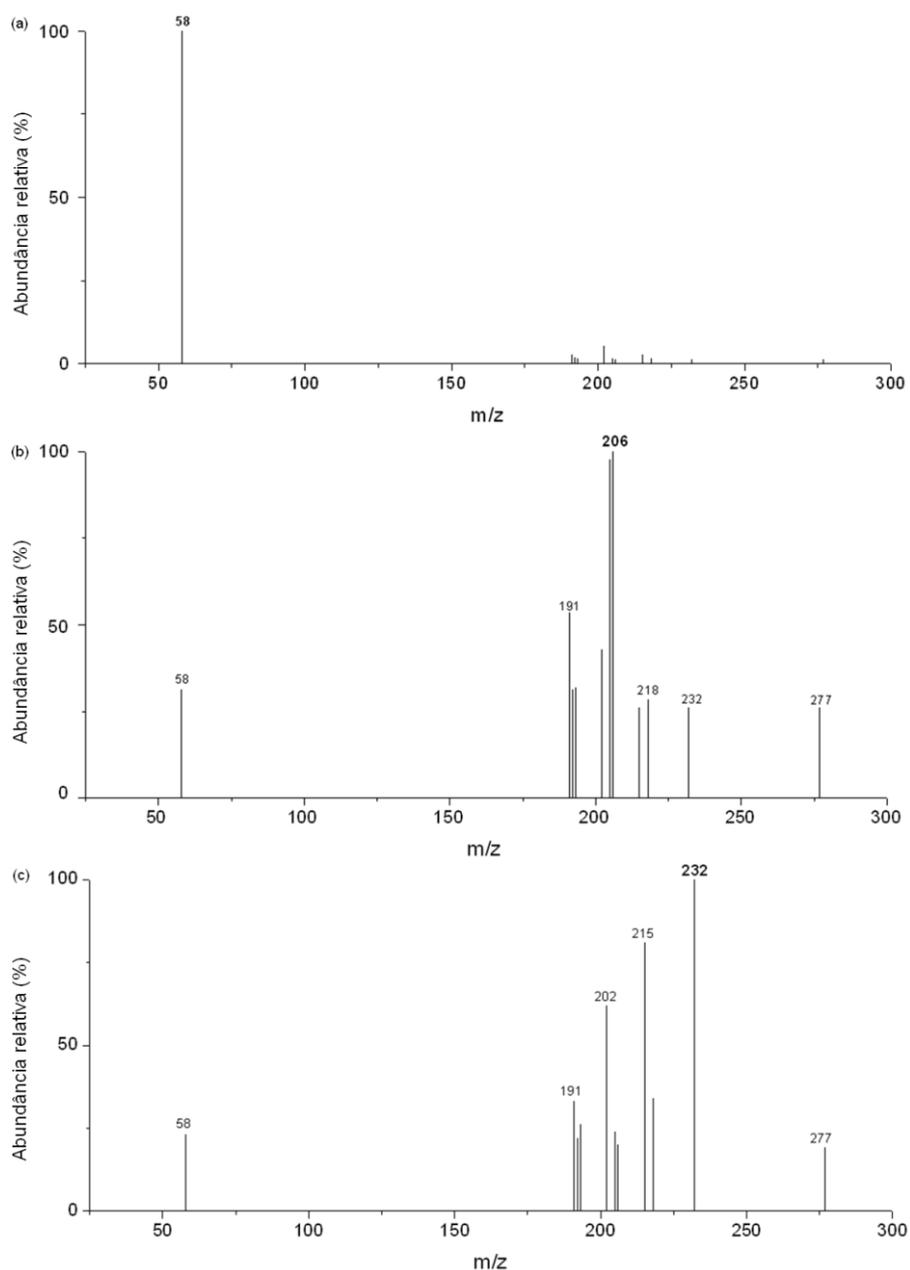


Figura 39 - Espectros de massas de uma solução de AMT ($9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; 100% acetonitrila) por 30 min: (a) AMT ; (b) fotoderivado de 206 Da e (c) fotoderivado de 232 Da.

Com o intuito de estudar a cinética de reação e a proporção em que os fotoderivados se formam após exposição da solução da AMT ao UV, a área do pico de cada um dos compostos foi monitorada após a irradiação de AMT entre 0 e 30 min. A AMT foi monitorada no pico de m/z 58 Da, enquanto que os fotoderivados nos picos de m/z 206 e 232 Da (Figura 40a). Pode ser constatado que a reação fotoquímica ocorre em duas etapas: (i) pela a fotólise da AMT e (ii) a pela formação dos fotoprodutos a partir de 10 min de reação no caso do em m/z 232 Da, e somente após 30 min de UV no caso do íon com m/z 206 Da. Ao graficar o logaritmo natural das áreas do pico majoritário da AMT, $\ln(A)$, durante o tempo de irradiação da molécula, t , entre 0 e 30 min, foi determinado que a fotólise da AMT segue uma cinética de reação de primeira ordem, $\ln(A) = \ln(A_0) + kt$, com a constante de reação de k , determinada como sendo $-0,097 \text{ min}^{-1}$, como mostra a Figura 40b.

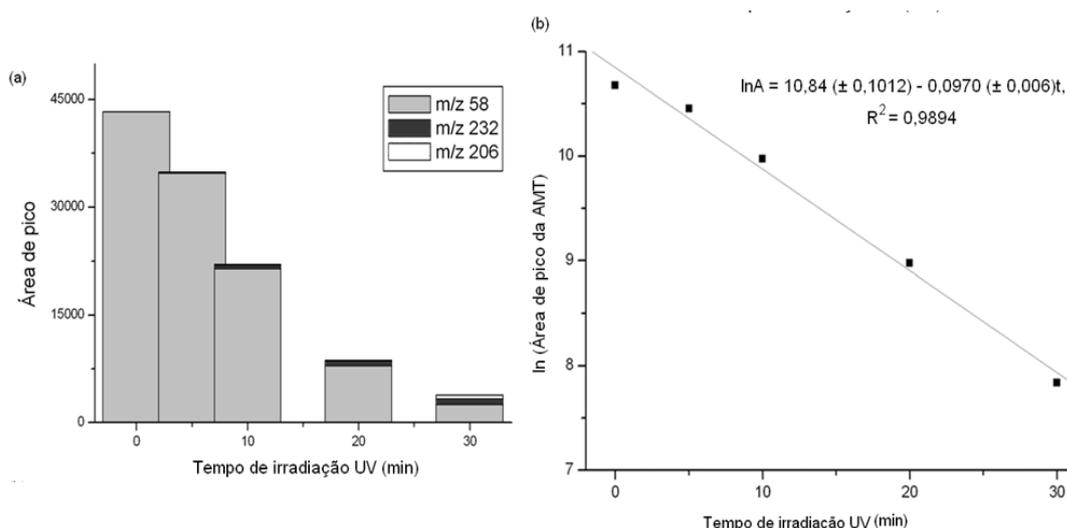


Figura 40 - (a) Formação dos fotoderivados da AMT monitorada pela área de pico em função do tempo de irradiação e (b) cinética de reação de fotólise da AMT na derivatização fotoquímica.

5.1.4. Parâmetros analíticos de mérito

A relação entre a concentração de AMT e a intensidade de fluorescência após a reação fotoquímica em condições otimizadas ($\text{HCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$ e 60 min de exposição ao UV) foi estudada, inicialmente, na faixa de concentração entre $2,5 \times 10^{-7}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 3$ para cada ponto). Como pode ser observado na Figura 41, há uma provável relação linear até a concentração de $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol}$

L⁻¹. Em concentrações maiores, há um desvio da linearidade dessa relação ($R^2 < 0,98$). Esse desvio da linearidade pode ter sido causado por efeitos de filtro interno. Nessas soluções mais concentradas, também foi observado um maior desvio padrão em cada ponto de medição, expresso no gráfico como barras de erros. A provável contribuição para o aumento do desvio padrão foi a utilização de filtro de transmitância de 50% para ajustar o sinal medido nas concentrações maiores a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para a medição da fluorescência das soluções com concentração maior a $1,0 \times 10^{-6}$, foi utilizado um filtro de transmitância de 25%, mas, o fator de erro associado a esse filtro foi menor.

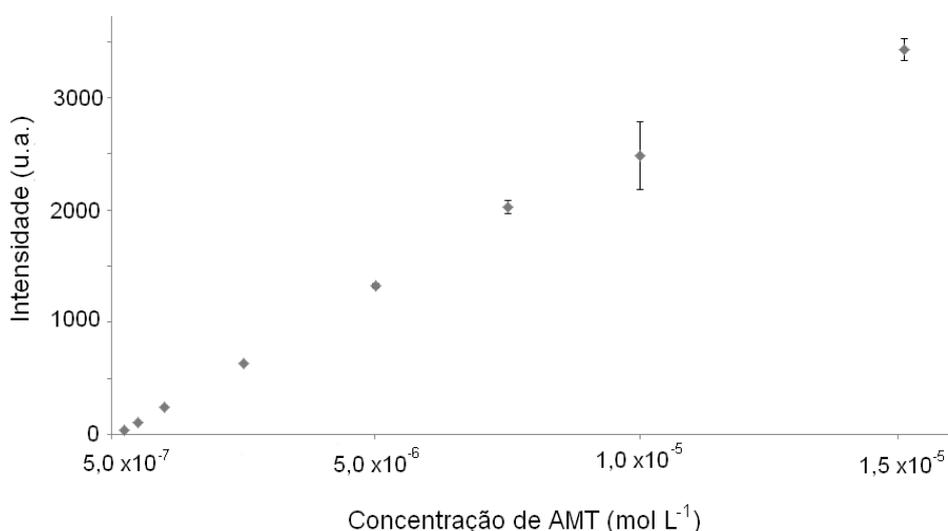


Figura 41 - Relação entre a concentração de AMT e a fluorescência após derivatização fotoquímica na condição otimizada (HCl $0,027 \text{ mol L}^{-1}$ e 60 min de exposição ao UV).

Dessa forma, a modo de evitar erros associados ao uso dos filtros de transmitância, a faixa linear para o método espectrofluorimétrico para a determinação indireta de AMT após (derivatização fotoquímica) foi validada até a concentração de $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$ para cada ponto). Após a análise de regressão, a equação da curva correspondente obtida foi de $Y = 2,8 \times 10^8 (\pm 1,9 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}) X - 3,4 (\pm 7,8)$; onde Y é a intensidade da fluorescência, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e X é a concentração da solução padrão da AMT (em mol L^{-1}). O coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica foi de 0,9998 e a análise do gráfico de resíduos não mostrou nenhuma tendência (Figura 42 a e b). De acordo com a ANOVA realizada, ambos os parâmetros apontaram para um comportamento linear, homocedástico, que relaciona a concentração da AMT com a intensidade do sinal fluorescente após derivatização fotoquímica. Outra análise de regressão mais específica, cujos resultados se mostram no Anexo D,

também apontou para um comportamento homeocedástico dos resíduos e por outro lado indicou que os dados pertencem a uma distribuição normal²⁷. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados utilizando o critério de $3s_b/m$ e $10s_b/m$, respectivamente, onde s_b corresponde ao desvio padrão da intensidade do ensaio do branco ($n = 10$) e m corresponde à sensibilidade da curva analítica. Os valores calculados para o método espectrofluorimétrico foram de $4,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

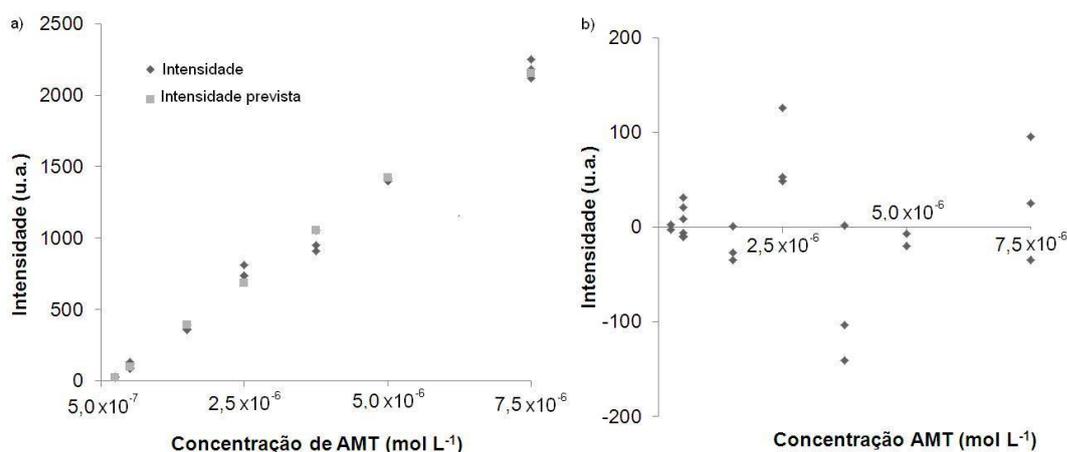


Figura 42 - a) Faixa linear do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica ($\text{HCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$ e 60 min UV) e b) respectivo gráfico de resíduos

A repetibilidade do método foi estimada mediante o coeficiente de variação (CV, expresso em %) obtido para as medições da solução do padrão de AMT ($n = 5$) preparadas no dia da análise, em três concentrações diferentes dentro da faixa linear do método. A precisão intermediária foi avaliada comparando a diferença entre as variâncias obtidas a partir de medições de soluções do padrão da AMT, preparadas em três concentrações diferentes dentro da faixa linear do método e em três dias consecutivos. Os valores do $F_{\text{calculado}} = 3,67; 1,04$ e $0,35$ para as soluções com concentrações de $5,0 \times 10^{-7}; 2,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, indicaram que não houve diferença significativa entre os resultados dos três dias de análise ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}} 3,88$) nas três concentrações testadas. Os resultados obtidos para os parâmetros de repetibilidade e precisão

²⁷ Pelo teste de Jarque-Bera, descrito no Anexo C, utilizado para testar se uma distribuição é normal (Valor crítico $< 5,2$ a 95% de confiança).

intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT estão descritos na Tabela 16. Observa-se que na concentração mais próxima ao LQ, os coeficientes de variação são maiores, enquanto que nas outras concentrações ao longo da faixa linear, os mesmos não ultrapassam 4% do valor da concentração em teste.

Tabela 16 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica na condição otimizada.

Concentração (mol L ⁻¹)	Repetibilidade (CV, %)	Precisão intermediária (%)
5,0 x 10 ⁻⁷	5,6	7,3
2,5 x 10 ⁻⁶	1,5	3,7
5,0 x 10 ⁻⁶	1,1	2,9

A incerteza de medição do método espectrofluorimétrico desenvolvido foi estimada para as três concentrações de 5,0 x 10⁻⁷; 2,5 x 10⁻⁶; e 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de AMT. As principais fontes de incerteza associadas à medição da concentração do analito foram divididas em quatro grupos: (i) preparação de soluções ; (ii) repetibilidade; (iii) precisão intermediária e (iv) parâmetros da curva analítica. As mesmas foram estimadas utilizando as equações e os procedimentos indicados no Capítulo 3. Os valores estimados para cada uma das fontes de incerteza mencionadas e a incerteza de medição associada a cada concentração são apresentados na Tabela 17.

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.

Fontes de incerteza	Concentração de AMT (mol L ⁻¹)		
	5,0 x 10 ⁻⁷	2,5 x 10 ⁻⁶	5,0 x 10 ⁻⁶
	Valor da incerteza (mol L ⁻¹)		
Preparação de soluções (u_{sol})	3,2 x 10 ⁻⁹	3,2 x 10 ⁻⁸	6,4 x 10 ⁻⁸
Curva analítica (u_{curva})	4,0 x 10 ⁻⁸	4,0 x 10 ⁻⁸	4,0 x 10 ⁻⁸
Repetibilidade (u_{rp})	1,1 x 10 ⁻⁸	1,8 x 10 ⁻⁸	2,6 x 10 ⁻⁸
Precisão intermediária (u_{pi})	2,0 x 10 ⁻⁸	5,2 x 10 ⁻⁸	8,5 x 10 ⁻⁸
Incerteza combinada (u_c)	4,6 x 10 ⁻⁸	7,5 x 10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁻⁷
u_c pela concentração testada, %	9,3	3,0	2,3
Incerteza expandida ($U_{k=2,53; 95\%}$)	1,2 x 10 ⁻⁷	1,9 x 10 ⁻⁷	2,9 x 10 ⁻⁷

Na Figura 43 é mostrado o gráfico de contribuição de cada uma das fontes de incerteza, em porcentagem, em relação ao valor da incerteza combinada (u_c). Observa-se que a contribuição da incerteza associada à curva analítica

apresenta maior influência sobre o valor da incerteza combinada na menor concentração avaliada ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), em torno de 8% do valor nominal. Quanto à incerteza associada à repetibilidade, não se constata uma influência relevante para o valor de u_c , para as três concentrações testadas. A precisão intermediária contribuiu consideravelmente no valor da incerteza combinada nas três concentrações avaliadas, dado que este parâmetro pondera as variações instrumentais e as variações no processo de derivatização fotoquímica em dias diferentes de análise.

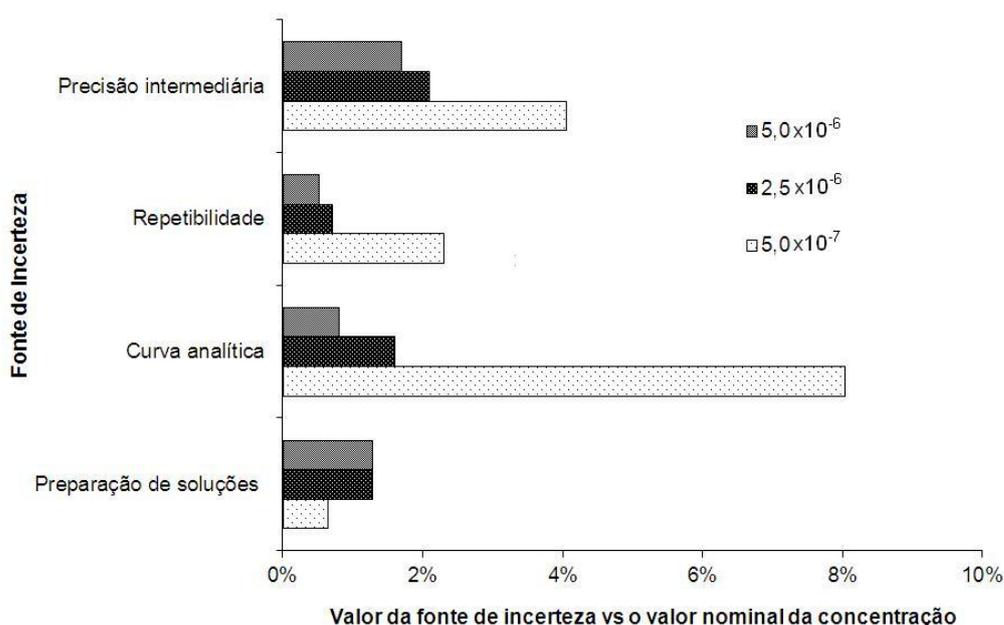


Figura 43 - Contribuição das fontes de incerteza associadas ao método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT, nas três concentrações avaliadas.

5.1.5.

Aplicação do método espectrofluorimétrico em medicamento e em material de referência farmacopéico

O método espectrofluorimétrico desenvolvido foi aplicado na determinação de AMT em um medicamento genérico (Medley, Brasil), contendo 25 mg do princípio ativo por comprimido. Foram preparadas soluções do medicamento ($n = 3$) em três concentrações correspondentes ao início, meio e final da faixa linear, $5,0 \times 10^{-7}$; $2,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos com as análises realizadas com o método proposto neste trabalho foram comparados com os obtidos por HPLC (Esfafili et al., 2007) e estão indicados na Tabela 18. Como pode ser observado o teste t de Student realizado não

indicou diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos de análise.

Tabela 18 - Recuperação em medicamento usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica

	Concentração de AMT analisada (mol L ⁻¹)					
	5,0 x 10 ⁻⁷		2,5 x 10 ⁻⁶		5,0 x 10 ⁻⁶	
	Método desenvolvido	Método comparativo	Método comparativo	Método comparativo	Método desenvolvido	Método comparativo
Recuperação (%)	94 ± 0,6	96 ± 1,1	97 ± 7,9	109 ± 0,3	100 ± 3,6	108 ± 1,0
Princípio ativo/comprimido	23,6 ± 0,15	24,1 ± 0,28	24,2 ± 1,97	27,2 ± 0,08	25,1 ± 0,91	27,0 ± 0,24
Teste t	2,39		2,69		3,70	
t _{crítico} (variâncias desiguais; u = 2; 95% de confiança, duas caudas)					4,304	

Uma amostra de material de referência farmacopeico (100,0%) adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – Fiocruz, Brasil) foi também utilizada neste trabalho para a avaliação do método proposto. Os resultados obtidos para as análises de soluções preparadas em três concentrações diferentes são apresentados na Tabela 19. Pode ser observado que as recuperações da AMT no material de referência foram satisfatórias para as concentrações testadas, dentro da faixa linear do método desenvolvido.

Tabela 19 - Recuperação em material de referência farmacopéico (INCQS – Fiocruz, Brasil), usando o método espectrofluorimétrico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica.

Concentração nominal (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
5,0 x 10 ⁻⁷	83 ± 3,6
2,5 x 10 ⁻⁶	94 ± 2,8
5,0 x 10 ⁻⁶	93 ± 3,0

Com o intuito de melhorar o poder de detecção para aplicar o método para determinação de AMT em fluídos biológicos, testes foram realizados visando a pré-concentração de AMT mediante uso de extração em fase sólida (SPE). Para tanto, 100 mL de soluções do padrão de AMT 5,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ foram concentradas para 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (volume final de 10 mL), segundo o procedimento detalhado no Capítulo 3. Baseando-se no sucesso dos resultados obtidos na pré-concentração de TBZ em saliva (Capítulo 4) utilizando metanol como solvente para a eluição do analito do cartucho de SPE, o mesmo eluente foi testado para a AMT. Porém, utilizando este solvente como único meio de

eluição da amostra, a recuperação do analito fortificado não foi satisfatória (Tabela 20). Esse resultado pode ser explicado devido a que a AMT é uma amina terciária comercializada na forma de cloridrato e, portanto, têm caráter iônico. Para a eluição de substâncias iônicas, procedimentos com eluição utilizado diferentes proporções de NH_4OH (1 a 3% em volume) com solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila, têm sido reportados (Lee et al., 1997; Kushnirr, et al., 1999; Shintani, 1990). Dado que o método desenvolvido para determinação indireta da AMT após a derivatização fotoquímica é realizado em meio ácido, a mistura de NH_4OH /solvente orgânico não pode ser utilizada para a eluição do analito. Uma alternativa para esse procedimento seria utilizar um par iônico para eluir a AMT do cartucho. Assim, testes foram realizados utilizando uma solução de solução aquosa 1% de NH_4Cl /metanol (1:99 v/v). Após a eluição do analito, a derivatização foi realizada nas condições otimizadas. Dado que a recuperação do padrão do analito utilizando solução de NH_4Cl /metanol 1:99 v/v foi satisfatória (Tabela 20), a mesma foi testada para eluir AMT após a fortificação de soro humano. O analito foi fortificado em plasma humano em concentrações consideradas tóxicas ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e eluído em solução de solução aquosa 1% de NH_4Cl /metanol (1:99 v/v). Após a separação da AMT por SPE, a derivatização fotoquímica foi realizada nas condições otimizadas e os resultados obtidos de recuperação da AMT após a fotoderivatização e análise por espectrofluorimetria foram satisfatórios ($104 \pm 3 \%$, $n = 3$).

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).

Eluente (1 mL)	Recuperação (%)
Metanol (100%)	15 ± 5
NH_4Cl 1% em metanol (1:99 v/v)	97 ± 2

5.2.

Adaptação da abordagem para a cromatografia a líquido

5.2.1.

Adaptação da derivatização fotoquímica da AMT para condições de cromatografia líquida e otimização da separação cromatográfica

A derivatização fotoquímica da AMT, otimizada para o método espectrofluorimétrico foi adaptada visando o uso do HPLC com detecção por fluorescência. A adaptação das condições foi necessária devido às restrições do sistema cromatográfico em relação ao uso de soluções com pH extremo,

evitando a corrosão de componentes de aço inoxidável, que pode ocorrer em pH < 2, ou para a preservação da fase estacionária da coluna cromatográfica, cuja degradação pode ocorrer em pH > 8. A adaptação da derivatização e a separação cromatográfica foram realizadas em três etapas: (i) adaptando o pH da reação fotoquímica; (ii) otimizando a separação cromatográfica e detecção do analito e (iii) otimizando do tempo de irradiação da amostra.

A faixa de pH ótima para uso da coluna cromatográfica RP-Cyano indicada pelo fabricante (entre 2 e 7) e o cuidado com as partes metálicas do sistema cromatográfico fazem do procedimento de derivatização fotoquímica desenvolvido para a espectrofluorimetria incompatível com seu uso na cromatografia líquida. Os testes preliminares de fluorescência da AMT após exposição ao UV (Figura 28) indicaram que, na faixa ácida, a derivatização fotoquímica da AMT é obtida mesmo em soluções com valores de pH 3 e 5 com produção de fluorescência com bandas em dois pares característicos de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, o de 233/345 nm e o de 263/325 nm. Embora não fosse a condição de indução de fluorescência máxima, decidiu-se por optar pelo pH 3 (tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹), visando aproveitar a tendência de aumento de sinal em função do aumento da exposição ao UV indicada na superfície de resposta do planejamento experimental preliminar (Figura 33). A concentração do tampão foi fixada em 0,02 mol L⁻¹ para se evitar o risco de precipitação do sal e consequente entupimento da coluna cromatográfica, formação de depósitos nas tubulações, conexões e na cabeça da bomba do sistema cromatográfico.

Uma solução de AMT (1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹), preparada em tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹, pH 3) previamente exposta ao UV (45 min), foi injetada no HPLC com o intuito de se verificar o comportamento dos fotoderivados da AMT no sistema cromatográfico com uma coluna RP-CN (150 x 4,6 mm, com diâmetro de partícula de 5 µm). A vazão utilizada nos experimentos (segundo as recomendações do fabricante da coluna) foi de 1,0 mL min⁻¹, com fase móvel de mesmo pH da solução de derivatização da AMT, isto é, composta por tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹ pH 3) e metanol e com um volume de injeção de 50 µL.

Nos experimentos iniciais foi utilizado o modo de eluição isocrático com proporções de fase móvel de tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹ pH 3)/ metanol variando de 30/70 para 50/ 50 v/v. O monitoramento de fluorescência foi realizado em 233/345 nm, comprimentos de onda mais intensos; obtidos nos testes preliminares em pH 3 (Figura 44).

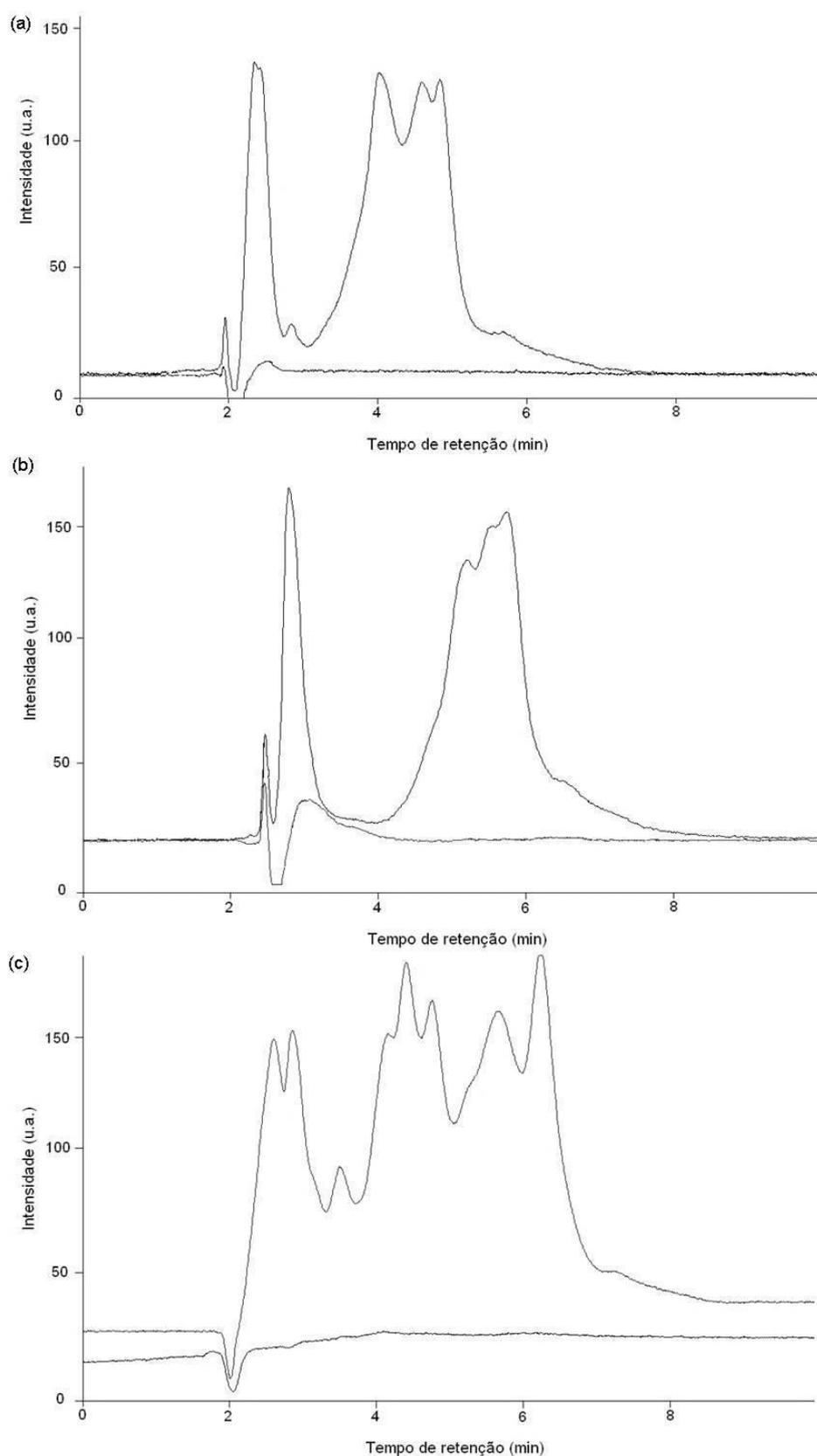


Figura 44 - Cromatogramas do fotoderivado ($AMT\ 1 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ em tampão fosfato $0,02\ mol\ L^{-1}\ pH\ 3$; irradiada por 45 min) e do ensaio do branco em proporções de fase móvel tampão fosfato ($0,02\ mol\ L^{-1}\ pH\ 3$)/metanol (v/v) de: (a) 30/70; (b) 40/60; e (c) 50/50; monitorados por detecção de fluorescência em 233/ 345 nm

Como pode ser observado nos cromatogramas da, utilizando essas condições experimentais, não foi possível a separação cromatográfica dos produtos gerados na derivatização fotoquímica. Esse resultado indicou a complexidade de produtos gerados na condição estabelecida. Ao se alterar a proporção tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3) e metanol para 60/40 (v/v) não foi detectado nenhum pico no cromatograma.

Por outro lado, verificou-se que com a utilização de detecção em 263/325 nm, o cromatograma obtido, utilizando eluição isocrática com fase móvel na proporção de tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3) e metanol igual a 40/60 (v/v), produziu um pico único, intenso e bem definido (cromatograma a da Figura 45). Em contraste, nas mesmas condições, o cromatograma obtido com o monitoramento em 233/345 nm produziu uma série de picos mal resolvidos e de intensidade bem menor que o observado em 263/325 nm (cromatograma b da Figura 45).

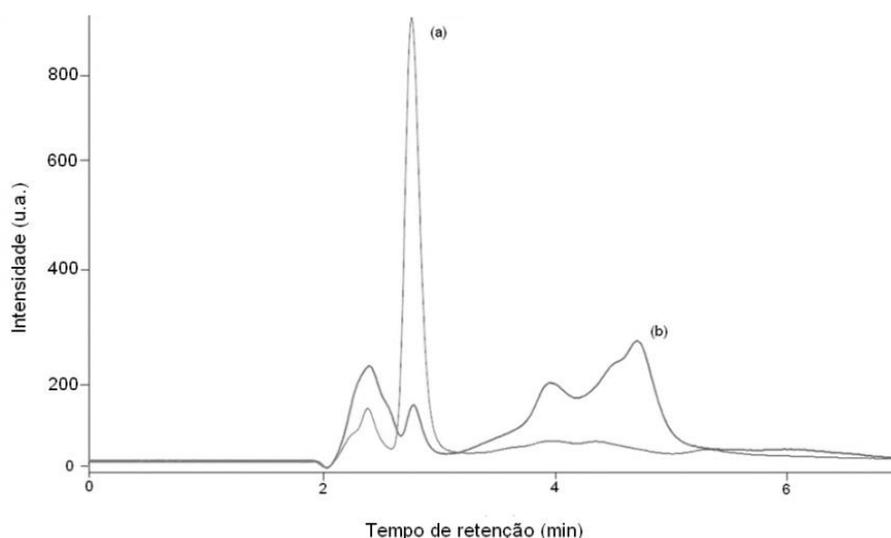


Figura 45 - Cromatogramas do fotoderivado ($\text{AMT } 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3; 45 min UV) em eluição isocrática e com fase móvel 40/60 v/v (tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH3 /metanol) monitorada em (a) 263/325 nm e (b) 233/345 nm.

Ajustes na proporção de tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3) e de metanol na fase móvel foram realizadas visando obter uma maior tempo de retenção e melhor simetria do pico do fotoderivado detectado em 263/325 nm. Esse ajuste serviu também para se avaliar a pureza do pico, pois caso houvesse um desdobramento do mesmo ao se mudar a proporção da fase móvel, constatar-se-ia a presença de mais de um fotoderivado na zona cromatográfica. Ao utilizar

uma proporção de fase móvel de 30/70 v/v, observa-se que o fotoderivado é eluído próximo ao volume morto do cromatograma (Figura 46). Em uma proporção de fase móvel maior que 50/50 (v/v), o pico do fotoderivado da AMT não foi observado. Dessa forma, para a cromatografia da solução de AMT submetida à fotoderivatização foi escolhida a fase móvel que consiste em tampão fosfato (0,02 mol L⁻¹ pH 3)/metanol 40/60 (v/v). Nessa condição, o tempo de retenção do fotoderivado foi 2,63 min e a simetria de pico foi igual a 1,20.

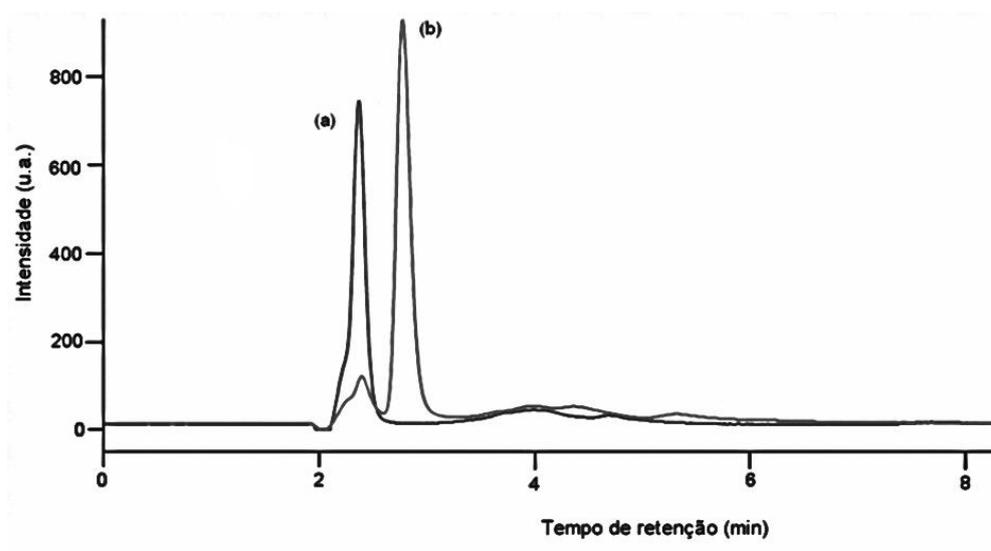


Figura 46 - Cromatogramas do fotoderivado (AMT $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH 3; 45 min UV) monitorado por detecção fluorimétrica (263/325 nm) nas proporções de fase móvel de: (a)30:70 e (b) 40:60 v/v (tampão fosfato/ metanol).

Um estudo univariado foi realizado para se avaliar a influência do tempo de exposição ao UV na intensidade da fluorescência (263/325 nm) do pico cromatográfico no tempo de retenção de 2,63 min. Para tal, soluções de AMT na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram expostas ao UV em intervalos de 10 min até 50 min. Paralelamente, a absorvância dessas soluções foi medida no comprimento de onda característico da AMT (240 nm) para constatar que a AMT sofre modificações ao longo do experimento.

A área de pico do fotoderivado e da AMT para cada injeção é apresentada na Figura 47 na qual se observa que o fotoderivado começa a se formar a partir de 10 min de exposição ao UV, sendo um patamar máximo de sinal alcançado após 30 min. O tempo de exposição ao UV de 30 min foi escolhido para os estudos de cromatografia visando à determinação indireta de AMT a partir de seu fotoderivado. Pode ser observado que nos testes iniciais para separar o

pico cromatográfico do fotoderivado da AMT (no cromatograma (c) da Figura 44) foi utilizado um tempo de irradiação de 45 min, no qual, os fotoderivado fluorescentes podem ter começado a se degradar formando um número maior de outras espécies fluorescentes o que pode explicar a diversidade de picos detectados nesse cromatograma.

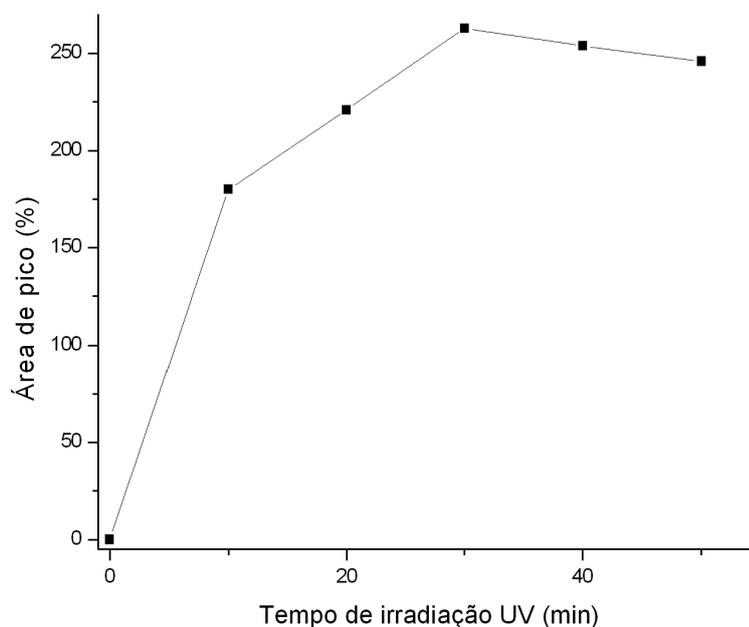


Figura 47 - Área de pico do fotoderivado (AMT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3) em função do tempo de exposição ao UV.

Um resumo das condições de fotoderivatização, de detecção e de separação escolhidas para a quantificação indireta da AMT é apresentado na Tabela 21. Essas condições foram usadas na etapa de validação e de aplicação do método cromatográfico desenvolvido. Os cromatogramas da AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e do seu respectivo branco, obtidos nas condições da Tabela 13 são mostrados na Figura 48.

Tabela 21. - Resumo das condições escolhidas para a determinação cromatográfica da AMT após fotoderivatização.

Descrição	Parâmetro experimental
Derivatização fotoquímica	Tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3) e 30 min de exposição ao UV
Coluna cromatográfica	RP-CN (ciano), $150 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$ de diâmetro
Fase móvel	Tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3)/metanol 40/60 (v/v)
Temperatura	Não controlada (ambiente)
Vazão	1 mL min^{-1}
Volume de injeção	$50 \mu\text{L}$
Detecção por fluorescência	263/325 nm
Tempo de retenção do fotoderivado	2,63 min

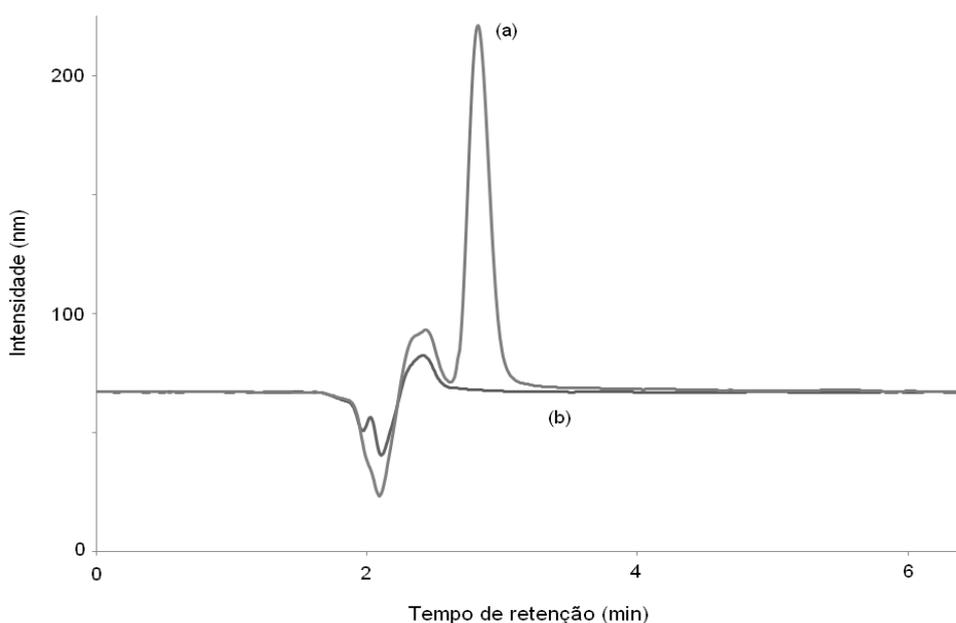


Figura 48 - Cromatogramas obtidos para: (a) AMT ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) ensaio em branco após tratamento fotoquímico. AMT preparada em tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3) exposta por 30 min ao UV. Fase móvel composta por tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3)/metanol 40/60 v/v. Detecção fluorimétrica em 263/325 nm.

5.2.2. Parâmetros analíticos de mérito

Para determinar a faixa linear do método, soluções de AMT (concentrações entre $2,5 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram derivadas fotoquimicamente utilizando as condições escolhidas para a determinação por HPLC. De acordo com os resultados obtidos²⁸, a faixa linear do método foi determinada até a concentração de $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, conforme a Figura 49. Após uma análise de regressão, a equação da curva analítica para o método cromatográfico proposto foi $Y = 6,2 \times 10^6 (\pm 1,3 \times 10^5)X + 0,55 (\pm 0,15)$; onde Y é a área do pico do fotoderivado da AMT e X é a concentração equivalente de AMT, em mol L^{-1} . O coeficiente de determinação, R^2 , da curva analítica foi de 0,997. A análise do gráfico de resíduos mostrou um comportamento homocedástico para os dados. Outra análise de regressão mais aprofundada

²⁸ Embora houvesse um comportamento linear utilizando concentrações maiores a $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, visando a aplicação em concentrações de interesse biológico do analito, e devido a que nas concentrações altas, a escala do detector de fluorescência foi quase atingida, a faixa de concentração validada foi escolhida até $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

(resultados mostrados no Anexo D) apontou que o comportamento dos resíduos não possui alguma tendência²⁹.

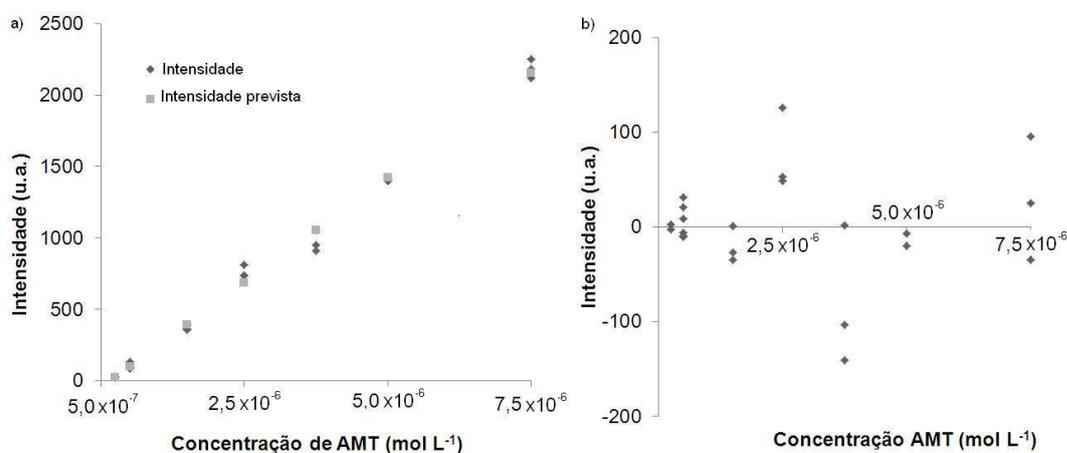


Figura 49 - a) Curva analítica do método cromatográfico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica (tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹, pH 3; 30 min UV) e b) respectivo gráfico de resíduos.

Os valores de LD e de LQ foram calculados utilizando o critério de $x + 3s_b$ e $x + 10s_b$, respectivamente, onde x é a média da menor concentração detectável no equipamento e s_b é o desvio padrão de 10 medições dessa solução de menor concentração. Os resultados apontaram para: LD de $5,4 \times 10^{-9}$ e LQ de $1,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

A repetibilidade do método cromatográfico para determinação indireta da AMT após derivatização fotoquímica foi estimada mediante o coeficiente de variação (CV, %), obtida para as medições da solução do padrão de AMT ($n = 5$) preparadas no dia de análise, nas mesmas condições, em três concentrações diferentes dentro da faixa linear: $2,5 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-7}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A precisão intermediária foi avaliada comparando as variâncias obtidas, a partir de medições de soluções do padrão da AMT, preparadas nas mesmas concentrações e em três dias consecutivos de análise, calculando o desvio padrão agrupado dos resultados para os respectivos dias. Os valores obtidos para $F_{\text{calculado}}$ foram: 1,31; 2,69; e 2,24 para as soluções com concentração de $2,5 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente, indicando que não houve diferenças significativas entre os dias de análise ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}} 3,88$;

²⁹ O teste de Jarque-Berra apontou para uma distribuição normal dos dados e apontou para uma leve assimetria da distribuição, conforme os gráficos do Anexo C.

95% de confiança) nas três concentrações testadas. Os resultados obtidos para a repetibilidade e a precisão intermediária do método cromatográfico (Tabela 22) apontam para um CV entre 9 e 12% na concentração testada próxima ao LQ ($2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e valores menores que 6% nas demais concentrações, ao longo da faixa linear do método desenvolvido.

Tabela 22 - Repetibilidade e precisão intermediária do método para determinação indireta AMT após derivatização fotoquímica por HPLC com detecção fluorimétrica.

Concentração testada (mol L^{-1})	Repetibilidade (%)	Precisão intermediária (%)
$2,5 \times 10^{-8}$	9,3	12,0
$5,0 \times 10^{-7}$	4,8	5,9
$2,5 \times 10^{-6}$	1,7	6,0

A estimativa da incerteza de medição do método cromatográfico desenvolvido foi realizada nas três concentrações dentro da faixa linear mencionadas anteriormente. As principais fontes de incerteza associadas à medição foram: (i) a preparação de soluções; (ii) a repetibilidade; (iii) a precisão intermediária e (iv) aos parâmetros da curva analítica. As mesmas foram estimadas utilizando as equações e os procedimentos indicados no Capítulo 3. Os resultados da estimativa da incerteza de medição para o método cromatográfico desenvolvido são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Estimativa da incerteza de medição do método cromatográfico para determinação indireta da AMT, após derivatização fotoquímica.

Fonte de incerteza	Concentração testada (mol L^{-1})		
	$2,5 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
	Valor da incerteza (mol L^{-1})		
Preparação de soluções (u_{sol})	$5,6 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^{-8}$	$5,6 \times 10^{-8}$
Curva analítica (u_{curva})	$6,4 \times 10^{-9}$	$6,9 \times 10^{-8}$	$6,9 \times 10^{-8}$
Repetibilidade (u_{rp})	$2,7 \times 10^{-9}$	$1,8 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-8}$
Precisão intermediária (u_{pi})	$3,1 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-8}$
Incerteza combinada (u_c)	$7,6 \times 10^{-9}$	$8,8 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$
u_c , %	30%	18%	3,8%
Incerteza expandida ($U_{k=2.52; 95\%}$)	$1,9 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-7}$

Na Figura 50 é mostrado o gráfico de contribuição de cada uma das fontes de incerteza anteriormente estimadas para cada concentração e comparadas com o valor da concentração nominal. Observa-se que na concentração próxima ao LQ, mesmo estimando o parâmetro especificamente para essa faixa de concentração, a contribuição associada à curva analítica é a fonte que mais

contribuiu ao valor da incerteza combinada. Também, dada a variabilidade da reação fotoquímica, a fonte de incerteza associada à precisão intermediária afetou consideravelmente o valor estimado da incerteza combinada nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$ e $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

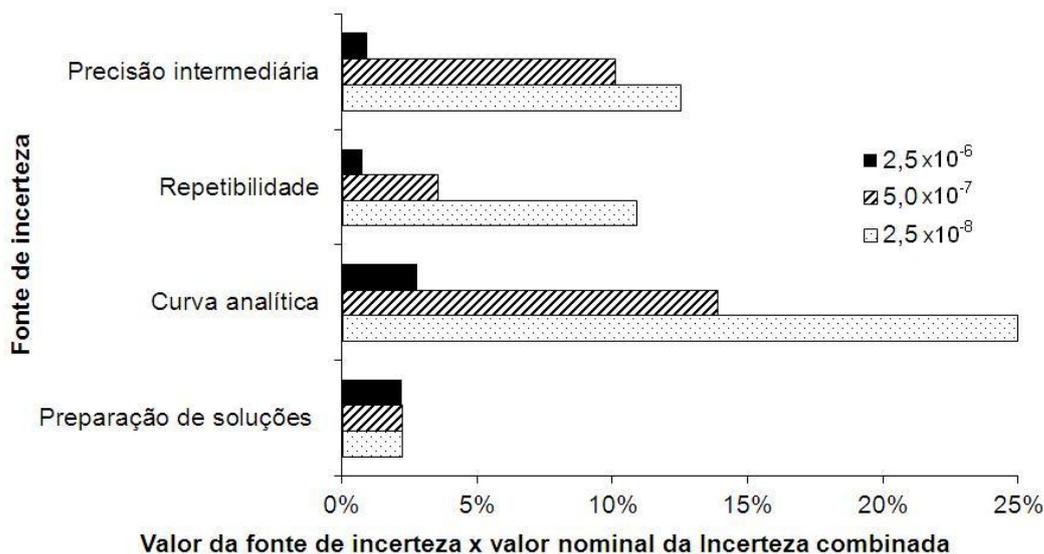


Figura 50 - Contribuição (%) das fontes de incerteza associadas ao método cromatográfico para determinação indireta da AMT, em três concentrações avaliadas ($2,5 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-7}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹).

5.2.3.

Aplicação do método cromatográfico na determinação indireta da AMT

O método cromatográfico desenvolvido foi aplicado para a análise de AMT em: (i) um medicamento genérico; (ii) material de referência farmacopéico; (iii) em soro humano fortificado. Os procedimentos detalhados para a separação da AMT nessas matrizes se encontram descritas no Capítulo 3.

O medicamento genérico (Medley, Brasil), contendo 25 mg de AMT por comprimido, foi analisado em três concentrações diferentes ($n = 3$) dentro da faixa linear do método, como mostrado na Tabela 24. Observa-se que, na concentração de $2,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de AMT não foi possível detectar o medicamento utilizando um método de referência (Esrafilí et al., 2007). Nas demais concentrações, os resultados de recuperação para o método cromatográfico desenvolvido foram satisfatórios. O teste t aplicado entre os métodos proposto e de referência mostrou que não há diferença significativa para o nível de 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$). Para as análises do material

de referência farmacopéico (100,0%, INCQS – Fiocruz) foram realizadas diluições para atingir três concentrações correspondentes ao início, meio e fim da faixa linear do método cromatográfico desenvolvido. Os resultados de recuperação obtidos, mostrados na Tabela 25, foram satisfatórios para as três concentrações testadas. Provavelmente, dadas às condições mais brandas de derivatização fotoquímica da adaptação do método cromatográfico, os desvios padrão obtidos nos ensaios de recuperação foram maiores que os resultados obtidos utilizando o método espectrofluorimétrico.

Tabela 24 - Resultados de recuperação da AMT em medicamento utilizando o método cromatográfico proposto e um método de comparação.

	Concentração de AMT (mol L ⁻¹)		
	2,5 x10 ⁻⁸	5,0 x10 ⁻⁷	2,5 x10 ⁻⁶
	Recuperação (%)		
Método cromatográfico desenvolvido	109 ± 7,3	103 ± 1,3	99 ± 0,4
Método de comparação*	---	105 ± 3,6	102 ± 1,1
teste t (considerando variâncias diferentes)	---	0,54	3,83
t _{crítico} (u = 2; 95% de confiança)		4,33	

* Esrafilí, et al 2007

Tabela 25 - Recuperação de AMT em material de referência farmacopéico (100,0%, INCQS – Fiocruz) pelo método por HPLC-DF para determinação indireta da AMT.

Concentração nominal (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
2,5 x 10 ⁻⁸	110 ± 9
5,0 x 10 ⁻⁷	111 ± 2
2,5 x 10 ⁻⁶	97 ± 5

Para as análises de soro humano, foi realizada uma fortificação de solução de AMT em uma concentração considerada tóxica³⁰ (1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹) na matriz de interesse. A limpeza da matriz fortificada foi realizada limpando o soro humano em um cartucho de SPE pré-condicionado com metanol e água, como descrito no Capítulo 3. Após várias lavagens com água destilada para eliminar a matriz, o analito foi eluído com a mesma solução utilizada na pré-concentração de soluções do padrão de AMT (método fluorimétrico), ou seja, mediante a utilização de um par iônico para eluir a AMT, com a solução de NH₄Cl/metanol (1:99 v/v). Após a eluição do analito, a derivatização fotoquímica e a separação cromatográfica foram realizadas nas condições da Tabela 20. Os procedimentos de SPE, derivatização fotoquímica e separação cromatográfica, permitiram a recuperação do analito com resultados satisfatórios (92 ± 4,5%, n = 3).

³⁰ Optou-se por escolher uma concentração considerada tóxica, já que a AMT pode estar presente no organismo na sua forma iônica, ou é metabolizada para nortriptilina.