

## 4

### Resultado e discussão: Otimização do procedimento de derivação fotoquímica

#### 4.1.

##### Informações preliminares

Entre todos os esteróides, apenas os estrogênios possuem fluorescência natural (Nozaki, 2001), sendo que esta característica foi usada para desenvolver um método analítico por HPLC - fluorescência (Gatti *et al.*, 1998). No caso dos glicocorticóides, Mattingly induziu fluorescência intensa (451/521 nm) de hidrocortisona e corticosterona, quando no estado sólido, por meio do tratamento com o ácido sulfúrico concentrado. Esse procedimento foi utilizado para a análise de plasma humano (Mattingly, 1962) e desde então passou a ser considerado o método fluorimétrico padrão para hidrocortisona. No entanto, além desse tratamento não funcionar para indução de fluorescência dos glicocorticóides em solução, ele não funciona para glicocorticóides sintéticos tais como prednisolona e triancinolona. Recentemente, foi desenvolvido no LEEA-PUC-RJ (Laboratório de espectrometria e eletroquímica aplicada-PUC-RJ) um procedimento de indução de fluorescência da molécula da hidrocortisona em solução (Cardoso *et al.*, 2004). No trabalho citado, o uso conjunto do tratamento com ácido sulfúrico, aquecimento e de um tratamento com radiação UV (40 min em reator de potência total de 24 W) permitiu indução de fluorescência intensa a 354/503 nm. Com base no artigo de Cardoso *et al.* (2004), estabeleceu-se o ponto de partida desse trabalho com os glicocorticóides sintéticos.

## 4.2.

### Estudo do efeito da radiação ultravioleta

#### 4.2.1.

#### Fluorescência dos glicocorticóides e comparação entre reatores

Conforme trabalho desenvolvido por Mason, Ward e Reilly (1992), as molécula dos corticosteróides no estado sólido sofrem hidrólise ácida após reagirem com ácido sulfúrico em presença de calor. Neste referido trabalho a hidrólise ácida só surtiu efeito para os corticosteróides naturais hidrocortisona (cortisol) e corticosterona, não sendo observado nos corticosteróides sintéticos tais como a dexametasona. Em outro trabalho, estudos de reatividade envolvendo um acetato de hidrocortisona mostraram que reações de oxidação são aceleradas por meio de aquecimento e na presença de radiação UV (Byrn, 2001).

Para se iniciar o trabalho desta dissertação, um conjunto de condições experimentais iniciais foram escolhidas e dois reatores fotoquímicos foram utilizados. Estes reatores se diferenciavam pela intensidade da potência da fonte luminosa; o primeiro reator com lâmpada de 24 W (4 lâmpadas de 6 W) e o segundo reator com lâmpada de 125 W (já descritos no capítulo 3). Além da diferença da intensidade de radiação das fontes luminosas, o calor dissipado nos reatores (devido ao funcionamento das lâmpadas) é diferente. No primeiro reator, o calor dissipado é menor, fazendo com que a temperatura atinja 30 °C no seu interior, se mantendo constante após 30 min de funcionamento. No reator com lâmpada de 125 W, a temperatura interna foi superior e crescente, atingindo 50 °C nos primeiros 10 min, 70 °C com 30 min e 80 °C após 60 min. Devido ao aumento contínuo da temperatura, uma ventoinha foi instalada para que a temperatura fosse mantida estável em 65 °C após 20 min da lâmpada acesa.

Nessa etapa, foram preparadas soluções dos analitos estudados (prednisolona e triancinolona acetato) na concentração de 2 µg mL<sup>-1</sup> em metanol/água, 40/60, v/v e acidificadas com ácido sulfúrico (concentração final de 1,5 mol L<sup>-1</sup>). Para cada par de dos glicocorticóides, também foi preparado um branco de reagente. Cada grupo de soluções, foi submetido a testes que totalizaram cinco procedimentos distintos. Os testes realizados são descritos abaixo (todas as soluções foram colocadas em tubos de quartzo e tampadas com tampa de vidro esmerilhado):

- Teste 1: As soluções de analito e branco não foram aquecidas e nem submetidas a tratamento fotoquímico;
- Teste 2: As soluções de analito e branco foram aquecidas em banho-maria a 80 °C, sem tratamento fotoquímico;
- Teste 3: As soluções de analito e branco foram colocadas no reator com lâmpada de 24 W previamente ligado (30 °C de temperatura interna) e irradiadas por 30 min.
- Teste 4: As soluções de analito e branco foram previamente aquecidas em um banho-maria a 80 °C e depois colocadas no reator com lâmpada de 24 W, que havia sido previamente ligado (30 °C de temperatura interna), e irradiadas por 30 min.
- Teste 5: As soluções de analito e branco foram colocadas no reator com lâmpada de 125 W previamente ligado (65 °C de temperatura interna) e irradiadas por 40 min.

Todas as soluções acima mencionadas foram levadas ao espectrofluorímetro para a medição de fluorescência. Para se obter os espectros fluorescentes, condições instrumentais de banda de passagem espectral (8 nm) e de velocidade de varredura (600 nm s<sup>-1</sup>) foram fixadas. A fim de se determinar os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação, efetuou-se varreduras seqüenciais de emissão a partir de 300 nm e de excitação a partir de 250 nm. Ao se obter uma banda de emissão, o máximo dessa banda foi fixado, enquanto o espectro de excitação foi varrido de 200 nm até um valor de comprimento de onda 50 nm abaixo do máximo de emissão encontrado.

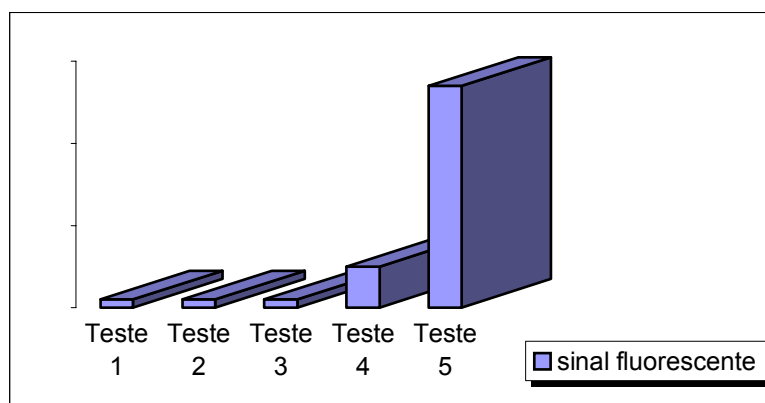


Figura 10: Fluorescência medida nas soluções-teste, para estudo de eficiência entre dois reatores diferentes.

Os resultados destes testes são mostrados na Figura 10, onde se observa que nenhuma fluorescência diferente da do branco foi observada para as soluções Teste-1, Teste-2 e Teste-3. Para a solução Teste-4, sinais fluorescentes (240/350 nm) de intensidade moderada (em torno de 20 unidades arbitrárias de fluorescência, ua) foram observados para ambos os glicocorticóides, indicando que o aquecimento da solução é primordial no processo de indução da fluorescência. Foi verificado posteriormente, que o aumento do tempo de exposição à radiação UV do reator de menor potência é irrelevante para a indução da fluorescência. Finalmente, para a solução Teste-5, sinais fluorescentes bem mais intensos (em torno de 130 ua) foram observados para os dois glicocorticóides sintéticos. Este resultado demonstra que o aquecimento e irradiação UV empregados simultaneamente (situação característica do reator com a fonte de UV de 125 W), é um procedimento mais efetivo para a indução de fluorescência destes analitos. Esse tratamento simultâneo (aquecimento e irradiação) também simplifica o procedimento experimental. Vale salientar que o uso desse reator sem o controle da temperatura proporcionou sinais fluorescentes pouco reprodutivos e expulsão das tampas dos vidros de quartzo, devido ao aumento da pressão no interior do tubo causado pela volatilização do sistema de solventes. De fato, como veremos adiante, a composição do sistema de solventes levou em consideração o fator pressão de vapor dos solventes envolvidos.

A partir dos resultados obtidos (Figura 10), decidiu-se pelo uso do reator com lâmpada de 125 W, sendo assim, todos os resultados mostrados a partir deste ponto são obtidos com esse aparato. Também, a partir das características espectrais obtidas nessa etapa, foi definido o par de excitação/emissão para os analitos em 240 nm para excitação e 350 nm para emissão (Figura 11).

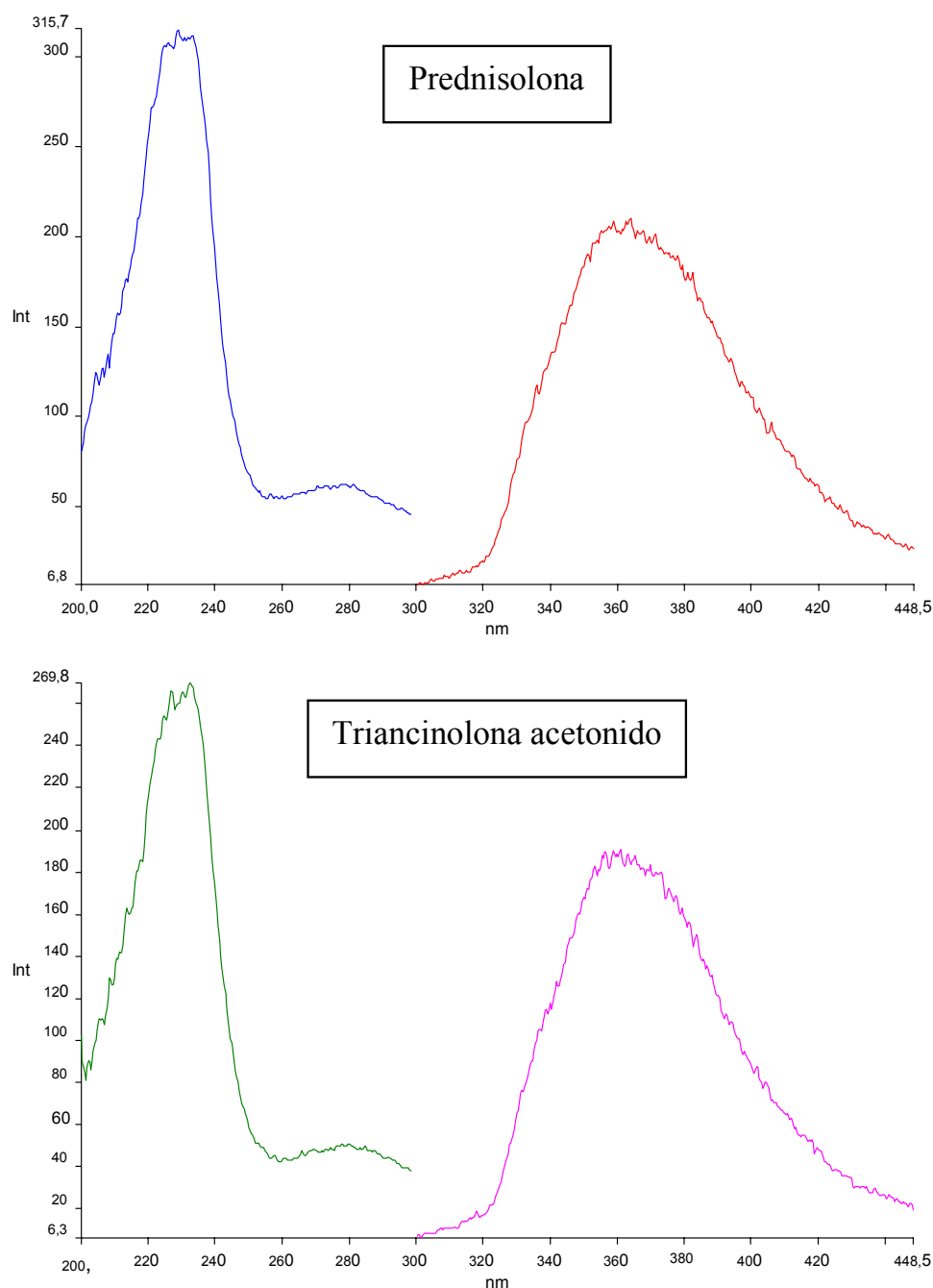


Figura 11: Espectros de fluorescência da prednisolona e triancinolona acetônico em solução de concentração de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol/água

Para garantir que o sinal fluorescente observado é realmente proveniente dos analitos de interesse, foram realizadas derivações fotoquímicas de soluções com concentrações crescentes dos glicocorticóides. A Figura 12 mostra um crescimento de sinal proporcional ao aumento da concentração da prednisolona em solução, o que indica que a fluorescência medida é proveniente dos analitos, sendo a resposta

diretamente proporcional a concentração. O comportamento para triancinolona acetinado foi o mesmo.

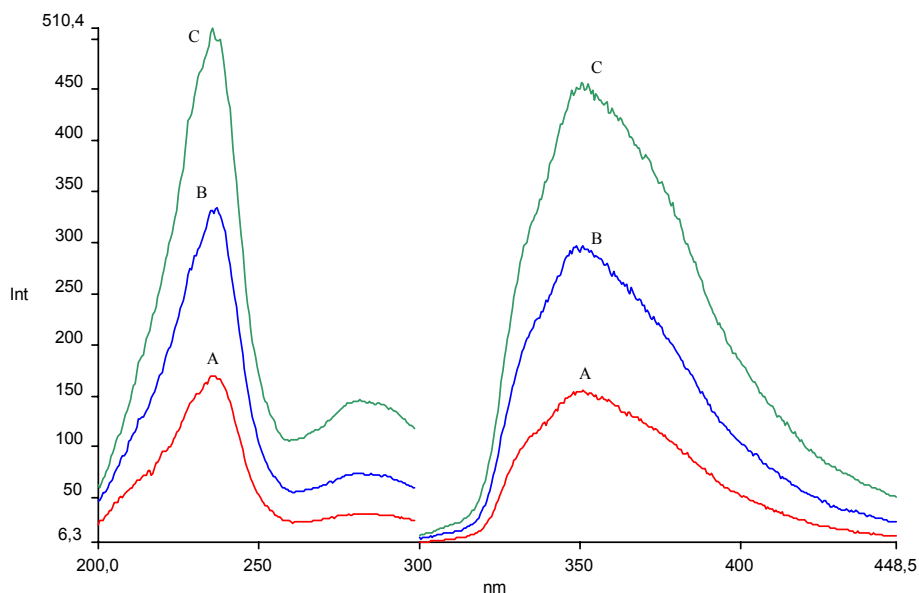


Figura 12: Espectros de fluorescência da prednisolona em função do aumento da concentração. As curvas A, B e C referem-se as concentrações de 8, 16 e 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente.

#### 4.2.2.

##### Otimização do tempo de irradiação

Como a exposição à radiação UV é essencial para a obtenção dos produtos fluorescentes, o tempo de irradiação foi otimizado visando à indução de fluorescência máxima. Para isto foram preparadas soluções de mesma concentração de cada glicocorticóides foram preparadas em triplicata e submetidas a períodos crescentes de exposição ao UV. As Figuras 13A e 13B mostram as curvas médias do sinal fluorescente líquido do analito ( $I_f - I_b$ ) em função do tempo de exposição ao UV para a prednisolona e triancinolona acetinado respectivamente. O sinal líquido é definido como o sinal da amostra subtraído do sinal do branco. De acordo com esses resultados, um tempo de irradiação de 40 min, comum para os dois analitos, foi escolhido. Este tempo foi definido visando a melhor relação de sinal de fluorescência em função do

tempo gasto de análise, uma vez que se torna desfavorável optar por um período maior para esta etapa do processo, considerando o gasto de energia e tempo de análise.

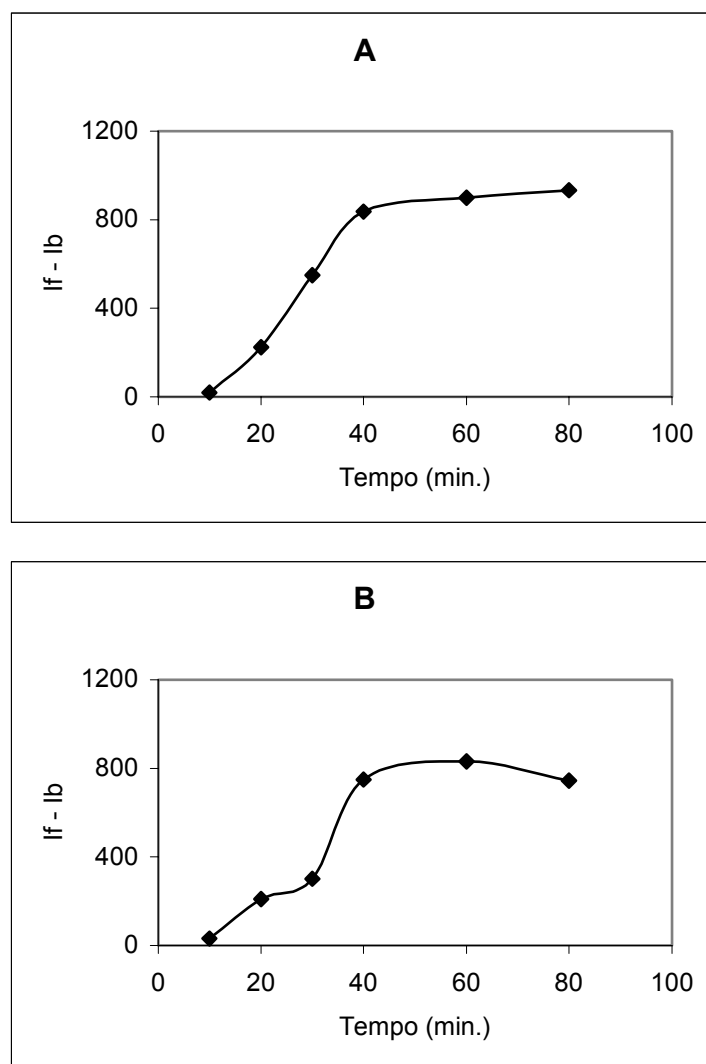


Figura 13: Efeito do tempo de exposição à radiação UV na fluorescência dos fotoprodutos da (A) prednisolona e da (B) triamcinolona acetato.

#### 4.2.3.

#### Absortividade molar e espectro de absorção

O uso espectroanalítico quantitativo das características fluorescentes dos fotoderivados da prednisolona e da triamcinolona foi o objetivo principal desse trabalho, sendo que não foi deslumbrada a identificação das estruturas dos fotoprodutos por motivos de tempo e infraestrutura laboratorial. No entanto seria interessante pelo

menos verificar se de fato existe alguma diferença de identidade entre os fotoprodutos gerados a partir dos dois glicocorticóides. Essa informação seria relevante, pois implicaria na possibilidade de uma possível determinação simultânea dos dois analitos por meio da aplicação de uma técnica de separação cromatográfica antes da detecção fluorimétrica.

Os espectros fluorescentes mostraram uma semelhança muito grande entre as bandas dos espectros de excitação e emissão para os dois analitos, inclusive com os mesmos comprimentos de onda máximos. Já as intensidades variaram entre as duas substâncias, tendo, no caso da triancinolona, valores de intensidade relativamente menores que o da prednisolona. A partir dos espectros de absorção pôde-se verificar claramente que existe uma modificação nas características das duas moléculas antes da derivação fotoquímica (Figura 14) e depois da derivação fotoquímica (Figura 15). Novamente, as duas substâncias possuem características espectrais similares. Antes do tratamento, ambos os glicocorticóides apresentam uma banda de absorção com máximo em 242 nm. Após o tratamento o máximo da banda de absorção foi deslocado para 211 nm.

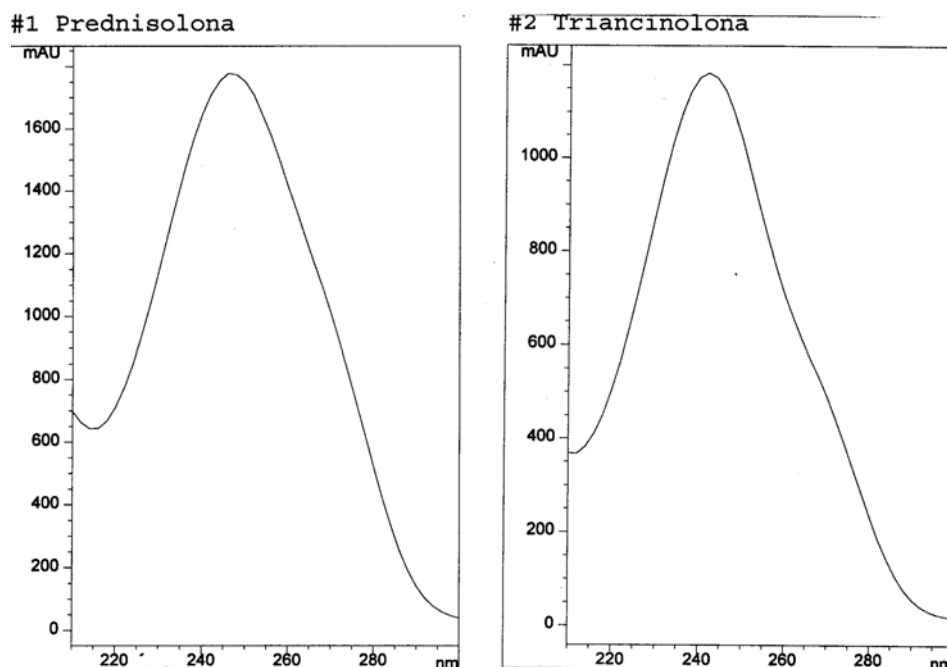


Figura 14: Espectros de absorção da prednisolona e triancinolona acetinado.



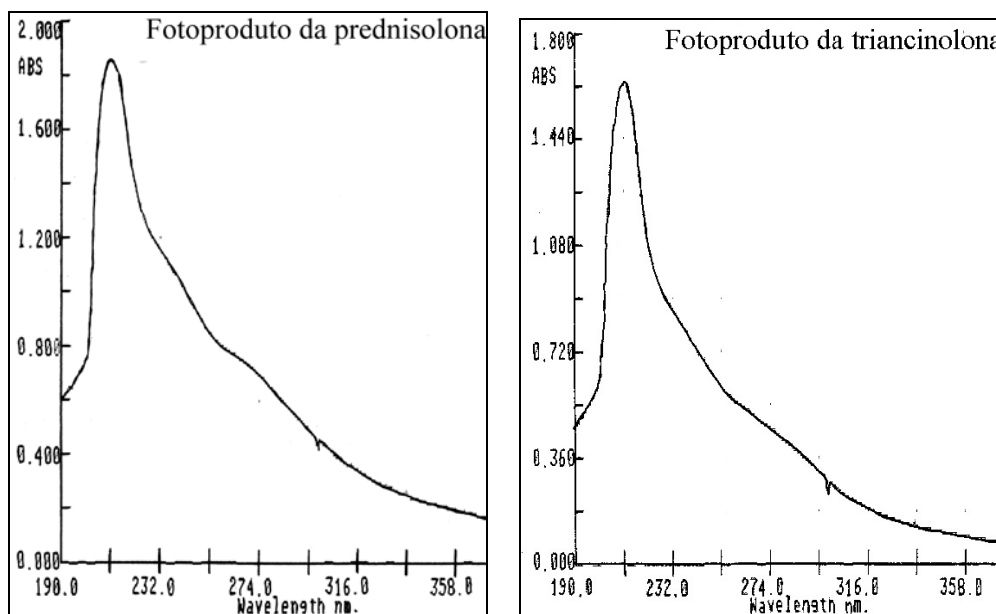


Figura 15: Espectro de absorção dos fotoprodutos da prednisolona e triancinolona acetônico, após processo de derivação fotoquímica.

Com base nos valores das absorvâncias em diferentes concentrações dos fotoprodutos, as absorvidades molares ( $\epsilon$ ) dos derivados dos dois glicocorticóides (Figura 16) puderam ser calculadas por meio da inclinação obtida pelo gráfico de absorvância versus concentração  $\text{mol L}^{-1}$  dos fotoprodutos. Os valores obtidos para  $\epsilon$  foram obtidos da curva de calibração média de três curvas feitas em dias diferentes medidos em 211 nm. Observa-se que para a triancinolona acetônico e para prednisolona os valores de  $\epsilon$  foram respectivamente de 13.622 e 11.286  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . A diferença de 17 % entre esses valores corrobora com o fato de existir uma diferença sistemática entre os sinais fluorescentes dos fotoprodutos, indicando que de fato as identidades dos dois pode ser diferentes. No entanto vale salientar que a repetitividade dos resultados obtidos com o procedimento de derivação é também em torno de 16 %, tornando-se difícil concluir algo a respeito da diferença estrutural entre os derivados.

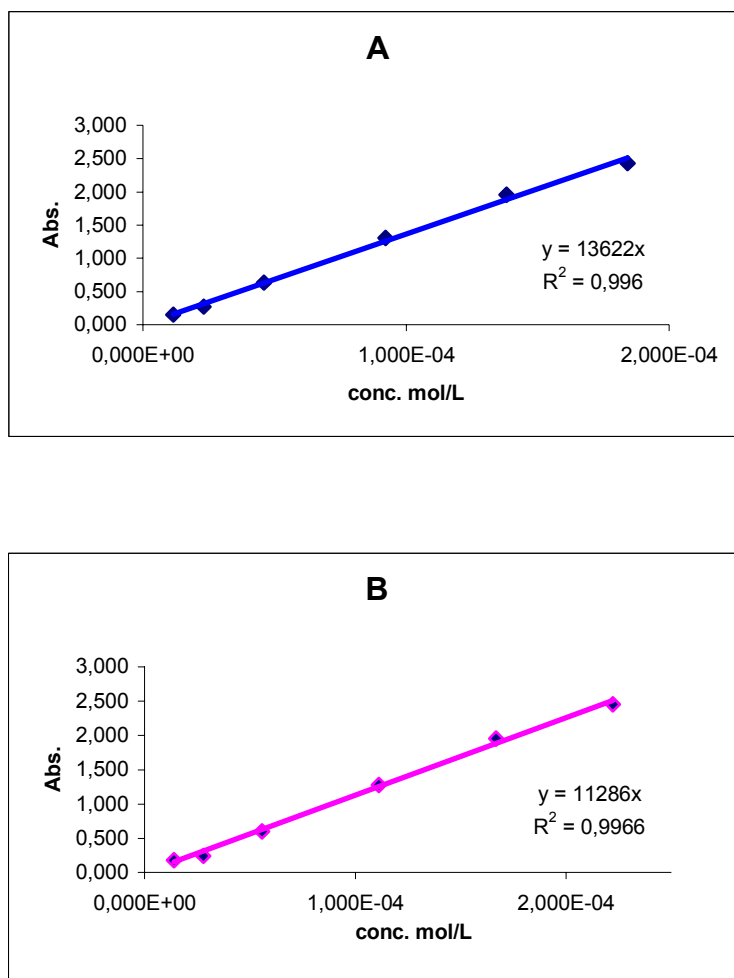


Figura 16: Curvas analíticas espectrofotométricas dos fotoprodutos da (A) triancinolona acetono e (B) prednisolona.

#### 4.3.

##### Otimização do sistema de solventes

Nessa etapa, foi otimizada a composição do sistema de solventes a ser utilizado no procedimento de derivação fotoquímica. A escolha do sistema de solventes deve ser norteada primeiro, pela solubilidade do analito e segundo pela influência que o solvente tem na magnitude do sinal fluorescente do analito. No entanto, nesse procedimento de indução fotoquímica, dois outros fatores se mostraram relevantes: O sinal do branco, devido à escolha da procedência do solvente, e a pressão de vapor final do sistema de solventes que influencia, na prática, a etapa de aquecimento durante a irradiação com UV.

### 4.3.1.

#### Solubilidade, pressão de vapor e magnitude do sinal fluorescente

Devido à baixa solubilidade da prednisolona e triancinolona acetinado em água e sua boa solubilidade em metanol, etanol e acetonitrila (The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1986), foram escolhidos o metanol e a acetonitrila como solventes. O uso do etanol foi descartado por proporcionar um alto sinal fluorescente no branco, dado este relatado por Cardoso *et al.* (2004) em seus estudos com a hidrocortisona. Comparativamente, a fluorescência observada em sistemas com acetonitrila foi em torno de 60 % da fluorescência obtida em sistemas contendo metanol. Assim, escolhido o metanol, a composição solvente orgânico/água foi então avaliada. Para tal, alíquotas das soluções-estoque dos analitos (em metanol) foram adicionadas em misturas de contendo metanol e água em proporções variadas. O volume final foi fixado em 5 mL e a concentração final dos analitos foi de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Um dos pontos cruciais para se estabelecer a composição do sistema de solventes foi a pressão de vapor da solução resultante. Esse fato ocorre por que durante a etapa de irradiação, a amostra é aquecida a 65  $^{\circ}\text{C}$  como já explicado na seção 4.2.1. Nessas condições, se a pressão de vapor do sistema de solventes é muito alta, a evaporação do solvente passa a ser de difícil controle, culminando no rompimento da tampa do tubo de quartzo e conseqüentemente modificando a concentração final do analito em solução. Esse problema pode ser controlado pela redução da proporção de solvente orgânico, lembrando que a pressão de vapor da água (23,8 mmHg)<sup>1</sup> é em torno de 5,3 vezes menor que o do metanol (123 mmHg). No entanto, nos casos da prednisolona e da triancinolona acetinado, o aumento da proporção de água em relação ao metanol (aumento da polaridade do sistema de solventes) acarretou na diminuição da fluorescência. Assim, uma condição de compromisso foi estabelecida levando em consideração o sinal fluorescente dos analitos e a viabilidade do aquecimento sem perda de solvente.

Foi utilizado para o teste, soluções com 20, 40 e 80 % de metanol em água. Todos os respectivos brancos também foram avaliados. As Figuras 17A e 17B mostram a variação do sinal de fluorescência líquida em função da proporção de solvente. O comportamento dos sinais da prednisolona e da triancinolona acetinado foi ligeiramente

---

<sup>1</sup> Valor da pressão de vapor a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Fonte: Handbook of Chemistry and Physics 75<sup>a</sup> ed., p. 1994-1995.

diferente. Para a prednisolona, verificou-se que o sinal fluorescente dos fotoprodutos aumenta na medida que o percentual de metanol é elevado, no entanto este acréscimo se mostrou menos acentuado quando se trata da triancinolona acetinado.

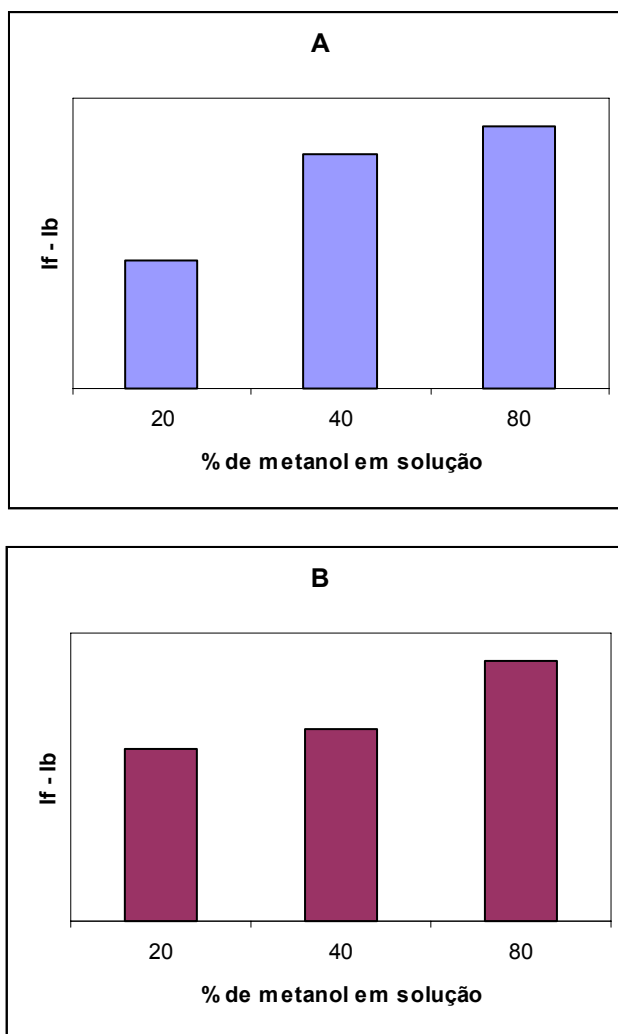


Figura 17: Efeito do percentual de metanol na mistura reacional na fluorescência do fotoproduto da (A) prednisolona e da (B) triancinolona acetinado.

Desde que a composição metanol/água (80/20, v/v), freqüentemente ocasionou rompimento da tampa do tubo de quartzo dentro do reator, essa proporção foi descartada mesmo sendo observado um sinal relativamente maior no caso da prednisolona. Embora observa-se um sinal de fundo maior devido maior carga de metanol (ver seção 4.3.2), para a continuação dos trabalhos escolheu-se o sistema de solventes metanol/água

(40/60, v/v), visando também garantir a solubilidade dos analitos quando se estiver trabalhando com quantidades maiores dos mesmos.

#### 4.3.2.

##### **Magnitude do sinal do branco**

No trabalho realizado por Cardoso *et al.* (2004), observou-se que o tratamento fotoquímico de soluções etanólicas provocou uma indução de intenso sinal fluorescente, sendo isso atribuído a presença de impurezas no solvente. O sinal fluorescente do solvente variou bastante de acordo com a procedência do mesmo. Assim, no citado trabalho, optou-se pelo uso da acetonitrila, por possuir um sinal de fundo significativamente menor.

Nos estudos realizados nessa dissertação, fez-se uma avaliação cuidadosa dos sinais de fundo dos solventes a serem utilizados. Em primeiro lugar, a água Milli-Q do laboratório, após adição do ácido sulfúrico e tratamento com radiação UV, não apresentou sinal fluorescente. Isto demonstra que as qualidades tanto da água quanto do ácido sulfúrico eram adequadas para o procedimento. Para os solventes orgânicos, verificou-se que tanto a acetonitrila quanto o metanol produziram sinal fluorescente equivalente após acidificação com (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e tratamento fotoquímico. No entanto esse sinal foi bem menos intenso que o observado com etanol. Como o metanol foi o solvente orgânico de escolha, foi feito um estudo para verificar a magnitude do sinal fluorescente em função da marca do solvente. Quatro marcas, disponíveis no LEEA-PUC-RJ e no Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, foram testadas. De acordo com os resultados da Tabela 2, que mostra a magnitude do sinal fluorescente do solvente (240/350 nm) após tratamento fotoquímico, observou-se que somente uma das marcas de metanol apresentou sinal de fundo significativamente maior que o dos outros testados. Por isso essa marca de metanol não foi recomendada para o procedimento de derivação fotoquímica. Dentre os solventes de menor sinal de fundo, o metanol de escolha foi o da TEDIA (metanol 1) por ser mais facilmente disponível no laboratório. Este estudo indicou que a procedência do metanol é importante e que o sinal de fundo é provavelmente oriundo de impurezas. A presença de sinal de fundo no metanol e a ausência do mesmo na água Milli-Q fazem com que a escolha da proporção de metanol

no sistema de solventes seja norteadada também por este fator. Assim, a escolha do sistema metanol/água (40/60, v/v) traz também vantagens do ponto de vista do sinal de fundo, em relação ao sistema metanol/água (80/20, v/v) onde ocorre um aumento do sinal do branco.

Tabela 2: Intensidade do sinal fluorescente de soluções metanólicas (metanol/água, 40/60, v/v) preparados com o metanol oferecido por 4 diferentes fornecedores à (240/350 nm) após o tratamento fotoquímico.

| Fornecedor e grau de pureza | Intensidade da fluorescência (ua) |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Metanol 1                   | 18,08                             |
| Metanol 2                   | 15,25                             |
| Metanol 3                   | 73,05                             |
| Metanol 4                   | 17,78                             |

#### 4.4.

#### Otimização do tratamento ácido

Para verificar a eficiência e importância do ácido no procedimento de derivação, foram preparadas soluções de prednisolona e triancinolona acetinado em metanol/água (40/60, v/v) sem o ácido sulfúrico e com o ácido sulfúrico, com o objetivo de se efetuar um teste comparativo. Todas as soluções foram acompanhadas de seus respectivos brancos, que geraram pequenos sinais fluorescentes. Verificou-se que na ausência do ácido sulfúrico nenhum sinal fluorescente diferente do sinal do branco foi observado, indicando a importância da acidificação no processo de derivação, para a obtenção dos fotoprodutos.

O tratamento com outros ácidos fortes e fracos foi utilizado, com a intenção de verificar se a identidade do ácido e/ou apenas a acidificação do meio é o fator mais importante no processo. Para esses testes, as concentrações finais dos ácidos foram fixadas em  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (igual à concentração do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizado até o momento). Efetuaram-se os testes com três ácidos fortes, dois deles com características oxidantes, tal qual o ácido sulfúrico, (ácido fosfórico e o ácido nítrico) e outro com o ácido

clorídrico. Nenhum sinal fluorescente diferente do branco foi obtido após tratamento fotoquímico. Resultado semelhante foi observado com o uso de um ácido fraco (ácido acético). Pode se concluir com este estudo que o sucesso do processo de derivação depende da identidade do ácido, não sendo provocado apenas pela concentração de íons  $H^+$  presentes em solução. Provavelmente o processo de derivação dos glicocorticóides é devido não somente a uma foto-oxidação (como sugerido por Byrn, 2001), mas também pela formação de grupos sulfônicos na molécula. Lembrando que a presença de grupos substituintes sulfônicos tem a tendência de favorecer ou amplificar a fluorescência molecular (Ingle, 1988).

Comprovada a importância da presença de  $H_2SO_4$ , ajustou-se a concentração final ideal para maximizar a fluorescência líquida das soluções dos analitos. Assim as concentrações finais do ácido iguais a 0; 0,35; 1,49; 2,51 e 3,40 mol  $L^{-1}$  foram testadas. Nesse caso, a concentração dos analitos foi fixada em 5  $\mu g mL^{-1}$  em metanol/água (40/60,v/v). Os sinais dos respectivos brancos também foram monitorados.

Os experimentos mostraram que o sinal do branco não variou significativamente com o aumento da concentração do ácido. A partir dos sinais líquidos de fluorescência ( $I_F - I_B$ ) observou-se que a partir da concentração de 0,35 mol  $L^{-1}$ , os sinais fluorescentes foram estatisticamente semelhantes (Figuras 18A e 18B) observando uma queda acentuada, no caso da prednisolona nas concentrações maiores que 2 mol  $L^{-1}$ . Definiu-se então, para os trabalhos seguintes, fixar a concentração em torno de 1,5 mol  $L^{-1}$ .

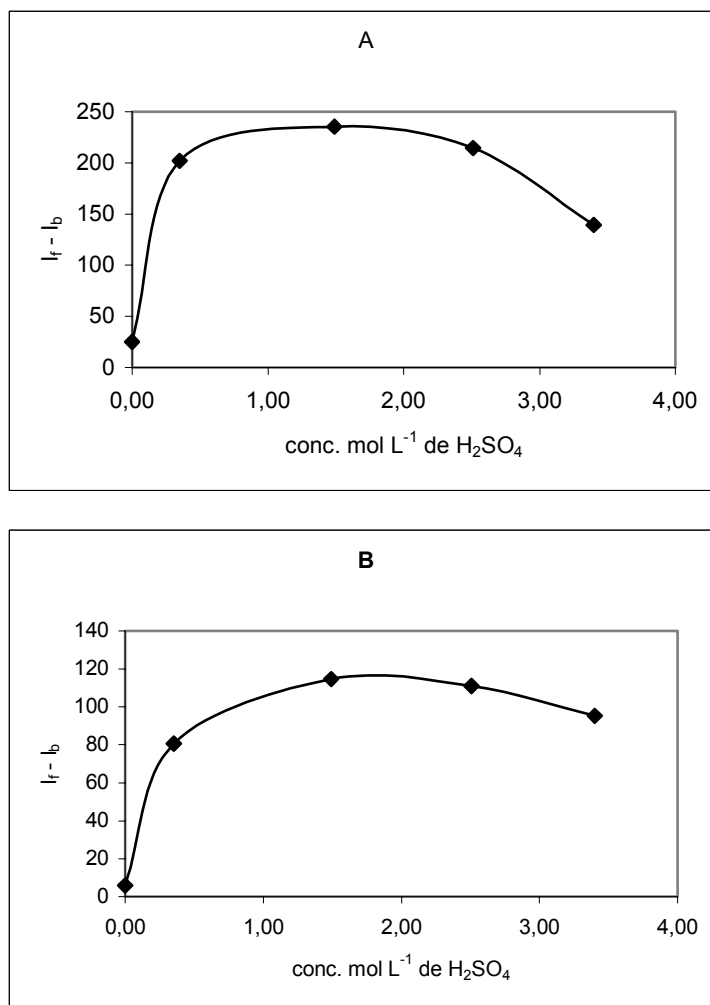


Figura 18: Curva do efeito da concentração do ácido sulfúrico em solução na fluorescência dos fotoprodutos da (A) prednisolona e (B) triancinolona acetone.

#### 4.5.

##### Escolha dos parâmetros instrumentais

Os parâmetros instrumentais relevantes para a varredura e leitura do sinal fluorescente dos fotoderivados fluorescentes da prednisolona e triancinolona no espectrofluorímetro são dois: A velocidade de varredura do espectro e a magnitude da banda de passagem espectral (spectral bandpass). Ambos devem ser otimizados visando melhor resolução, intensidade e precisão das leituras de fluorescência.

A velocidade de varredura indica o tempo de duração para obtenção de um espectro, e, conseqüentemente é o tempo que a radiação de comprimento de onda



característico interroga a amostra. Quanto mais lenta a velocidade de varredura, maior esse tempo de interrogação. Como o sinal fluorescente emitido por comprimento de onda é um resultado médio, sendo maior o tempo de interrogação (menor velocidade de varredura) menor o ruído do espectro. Assim, foram estudadas velocidades de varredura de 200, 600 e 1200 nm s<sup>-1</sup> (Figura 19). Como esperado, o espectro varrido em 1200 nm s<sup>-1</sup>, mostrou um sinal com mais ruído. Já os espectros utilizando 200, 600 nm s<sup>-1</sup> mostraram-se muito parecidos, com o formato das bandas mais suave. Assim, optou-se pela velocidade maior de 600 nm s<sup>-1</sup>.

A banda de passagem espectral ( $s'$ ), é o parâmetro que indica a faixa de comprimentos de onda (ou frequência) da radiação de excitação que incide na amostra e atinge o detector em um determinado momento. Esse parâmetro  $s'$  é dado pelo produto entre a dispersão linear recíproca do monocromador ( $R_d$ ) e a largura das fendas de entrada e saída do instrumento ( $W$ ).

$$(9) \quad s' = R_d W$$

O  $R_d$  representa o número de intervalos de comprimentos de onda (em nm) contido em cada unidade de intervalo de distância do plano focal do sistema óptico (em mm). Como  $R_d$  é constante e característico para cada instrumento, o parâmetro só pode ser mudado pela variação da largura da fenda (em mm). Assim, quatro valores de  $s'$  (2,5; 5; 8 e 15 nm), obtidos pela variação do tamanho da fenda, foram testados. O parâmetro influencia drasticamente as características do espectro, alterando a intensidade e a largura das bandas espectrais (dada pela largura na metade da intensidade da banda,  $\Delta\lambda$ ), como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4 respectivamente para a prednisolona e triancinolona acetato. Na Figura 20, pode se observar claramente o efeito nas bandas de excitação e emissão, inclusive com ruído maior para os menores valores de  $s'$ .

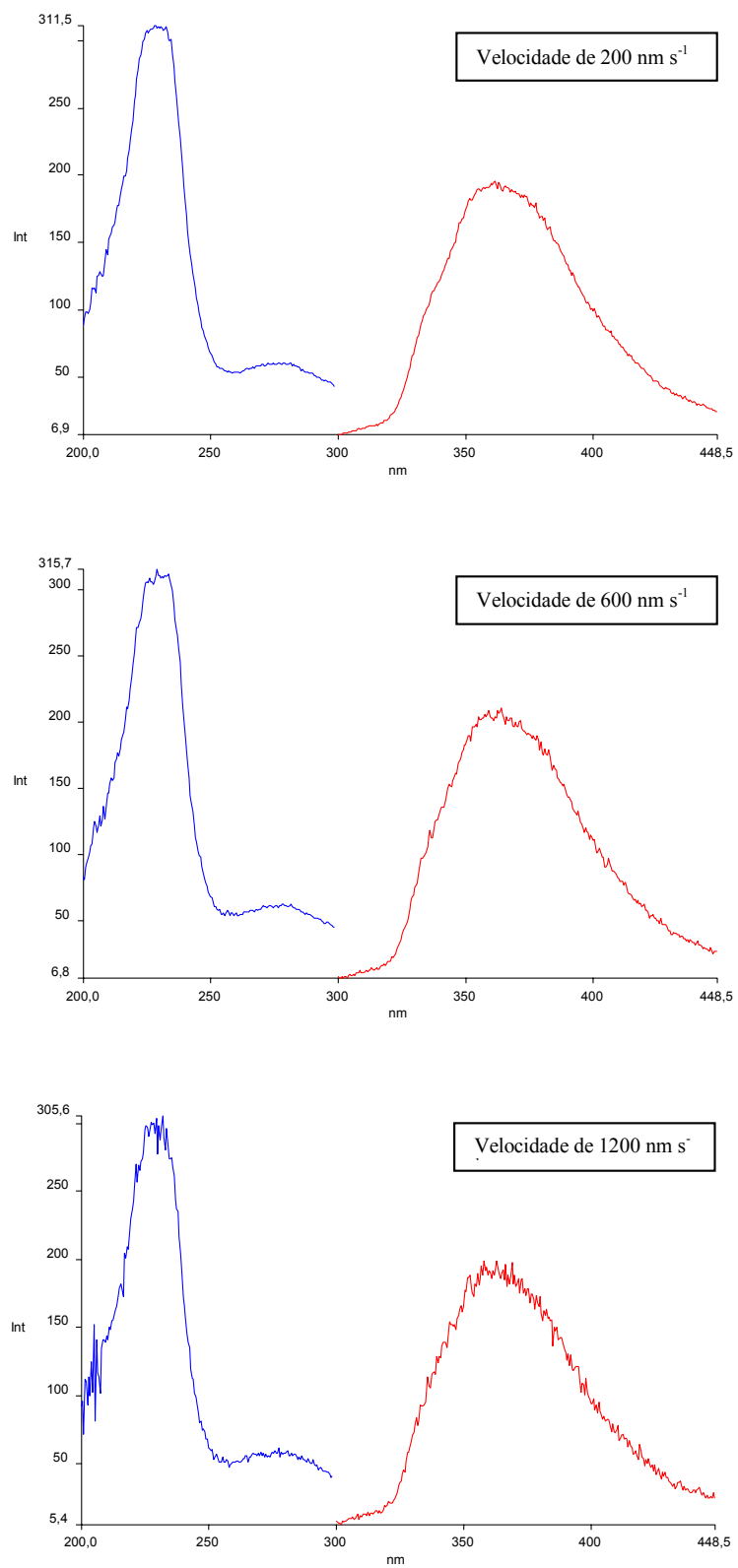


Figura 19: Efeito da velocidade de varredura no espectro de fluorescência dos derivados dos glicocorticóides.

Tabela 3: Efeito do valor da banda de passagem espectral no espectro fluorescente da prednisolona.

| Banda de passagem espectral<br>(nm) | Intensidade da fluorescência<br>(ua) | $\Delta\lambda$ (nm) |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 2,5                                 | 69,4                                 | 61,5                 |
| 5,0                                 | 133,9                                | 62,0                 |
| 8,0                                 | 210,9                                | 66,0                 |
| 15,0                                | 231,3                                | 70,0                 |

Tabela 4: Efeito do valor da banda de passagem espectral no espectro fluorescente da triancinolona acetinado.

| Banda de passagem espectral<br>(nm) | Intensidade da fluorescência<br>(ua) | $\Delta\lambda$ (nm) |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 2,5                                 | 45,6                                 | 59,8                 |
| 5,0                                 | 118,1                                | 59,3                 |
| 8,0                                 | 210,3                                | 62,7                 |
| 15,0                                | 219,6                                | 66,0                 |

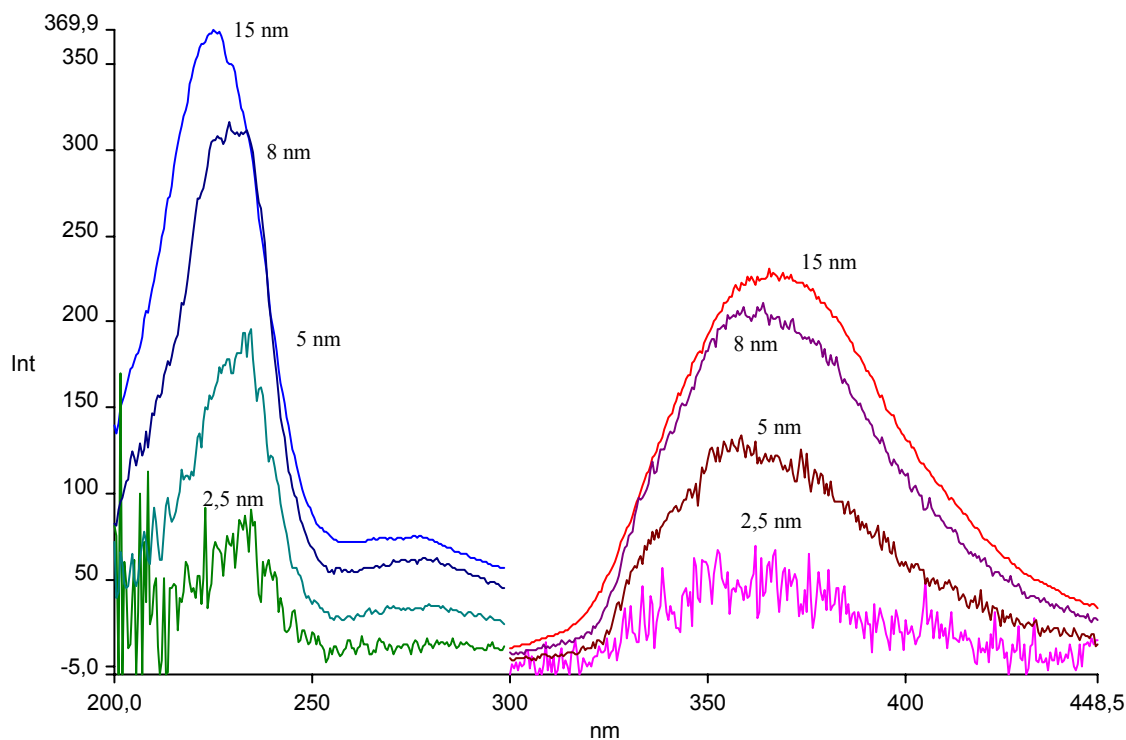


Figura 20: Efeito do valor da banda de passagem espectral nos espectros fluorescentes da prednisolona e da triancinolona.

Observa-se que para 2,5 e 5 nm tem-se espectros com maior nível de ruído e significativamente menos intensos do que o observado para 8 nm de banda de passagem espectral. Para valores de 15 nm, não se observa ganho significativo em intensidade que justifique um aumento de  $\Delta\lambda$ . O parâmetro  $\Delta\lambda$  pode ser relevante do ponto de vista da resolução espectral durante a análise de amostras complexas. Assim, um valor de 8 nm foi selecionado para os trabalhos.

#### 4.6.

##### Resumo das condições instrumentais e experimentais

A escolha das condições instrumentais e experimentais ótimas levou em consideração tanto a sensibilidade do sinal fluorescente quanto à praticidade do procedimento experimental. A seguir (Tabela 5), um resumo dessas condições é mostrado. Vale salientar que essas condições foram utilizadas para a validação dos

métodos de determinação de prednisolona e triancinolona acetato em medicamentos, descrito no próximo capítulo.

Tabela 5: Resumo das condições experimentais e instrumentais utilizadas na derivação fotoquímica da prednisolona e triancinolona acetato.

| Parâmetro                                      |                           |
|--|---------------------------|
| $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$                   | 240nm/350 nm              |
| Banda de passagem espectral                    | 8 nm                      |
| Velocidade de varredura                        | 600 nm s <sup>-1</sup>    |
| Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,5 mol L <sup>-1</sup>   |
| Sistema de solventes                           | Metanol/água (40/60, v/v) |
| Tempo de irradiação                            | 40 min                    |
| Temperatura interna do reator                  | 65 ± 5 °C                 |

Para efeito prático do trabalho foi testada a estabilidade da mistura reacional, de forma que a solução metanol/água (40/60, v/v) acidificada na concentração de 1,5 mol L<sup>-1</sup> com ácido sulfúrico ficasse disponível para o uso no procedimento de derivação. A solução foi testada por até seis dias após o seu preparo, não havendo alteração significativa nas leituras dos sinais de fluorescência da solução sem a presença do analito (branco) e da solução contendo prednisolona na concentração de 2,3 µg mL<sup>-1</sup>, após terem sido irradiadas conforme o procedimento padrão. Assim, desta forma, pode-se trabalhar com uma solução estoque de analito que fique acondicionada sob refrigeração por até 6 dias. Na prática a solução estoque de analito era guardada por até 24 h. O sistema metanol/água (40/60, v/v) acidificado passou a ser chamado de “mistura reacional” quando empregado nas determinações analíticas. Essa mistura reacional foi usada até seis dias após o preparo.

## 4.7

### Estabilidade dos fotoprodutos

É importante se conhecer a estabilidade dos fotoprodutos formados a partir da derivação fotoquímica dos glicocorticóides para que se possa descobrir se existe um tempo limite para se realizar a medição da fluorescência. Esta instabilidade em potencial pode além de influenciar a sensibilidade da medição, afetar também a precisão dos resultados se existir variação significativa de fluorescência após a retirada do material do reator.

Soluções acidificadas de prednisolona e triancinolona acetato ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  preparadas em metanol/água, 40/60, v/v) foram submetidas ao tratamento fotoquímico pelo período de 40 min. Logo após retirado do reator, a fluorescência das soluções foi medida. Aliquotas dessa solução foram então guardadas e medidas novamente em intervalos específicos de tempo após a retirada do reator (2, 6, 12, 24 e 48 h). As soluções dos fotoderivados foram acondicionadas em três condições distintas: a) temperatura ambiente e exposto à luz ambiente, b) no refrigerador ( $5^{\circ}\text{C}$ ) e c) temperatura ambiente e no escuro. Os sinais de seus respectivos brancos também foram monitorados.

Constatou-se que o comportamento da fluorescência líquida das soluções, independe da maneira na qual estas são estocadas, não se altera ao longo do tempo (Figura 21 e 22). Embora os sinais de fluorescência do branco e da solução do analito, apresentem tendência de aumento ao longo do tempo, a fluorescência líquida do sinal analítico permanece estável por até 48 horas (tempo máximo testado). Com esta observação conclui-se que o aumento da fluorescência não é proveniente da presença do analito na solução, e sim de impurezas que provavelmente estão presentes nos reagentes da mistura reacional (branco).

Para padronizar o procedimento, as medições de fluorescência de todas as soluções foram feitas em até 24 h após terem sido retiradas do reator, sendo guardadas sob refrigeração.

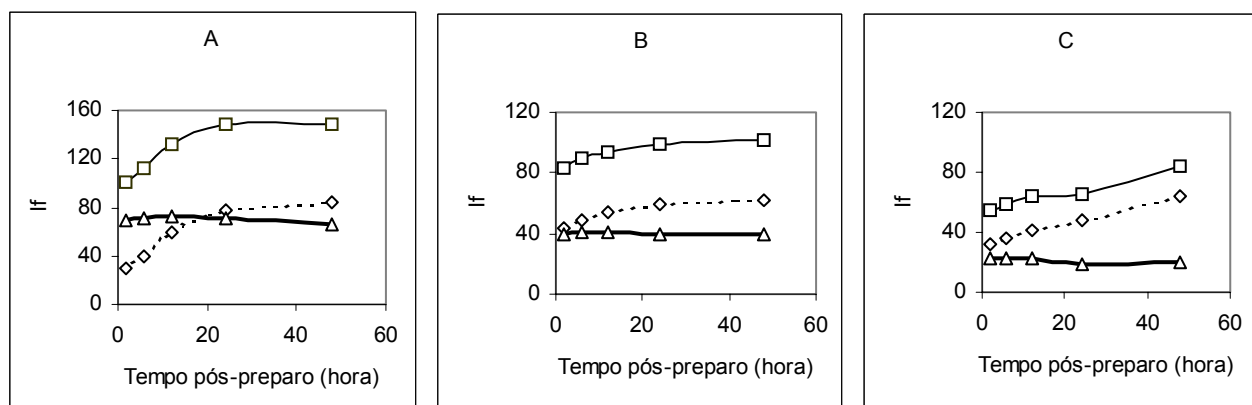


Figura 21: Estudo da fluorescência do fotoproduto da prednisolona em função do tempo. Soluções acondicionadas em (A) temperatura ambiente, (B) refrigerado a 4°C e (C) temperatura ambiente com ausência da luz. As curvas indicam a intensidade fluorescente do branco  $I_b$  ( $\diamond$ ), do analito  $I_f$  ( $\square$ ) e fluorescência líquida  $I_f - I_b$  ( $\Delta$ ).

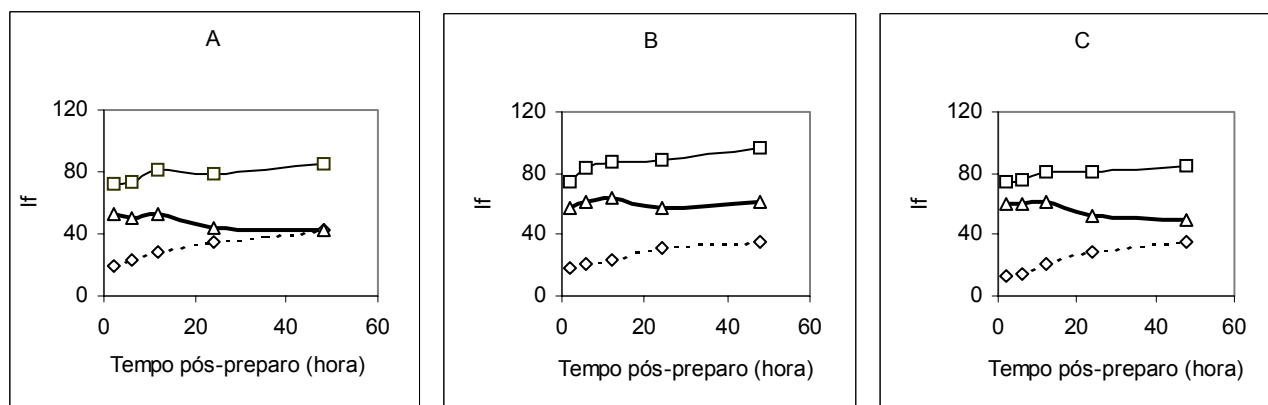


Figura 22: Estudo da fluorescência do fotoproduto da triancinolona acetônico em função do tempo. Soluções acondicionadas em (A) temperatura ambiente, (B) refrigerado a 4°C e (C) temperatura ambiente com ausência da luz. As curvas indicam a intensidade fluorescente do branco  $I_b$  ( $\diamond$ ), do analito  $I_f$  ( $\square$ ) e fluorescência líquida  $I_f - I_b$  ( $\Delta$ ).