



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

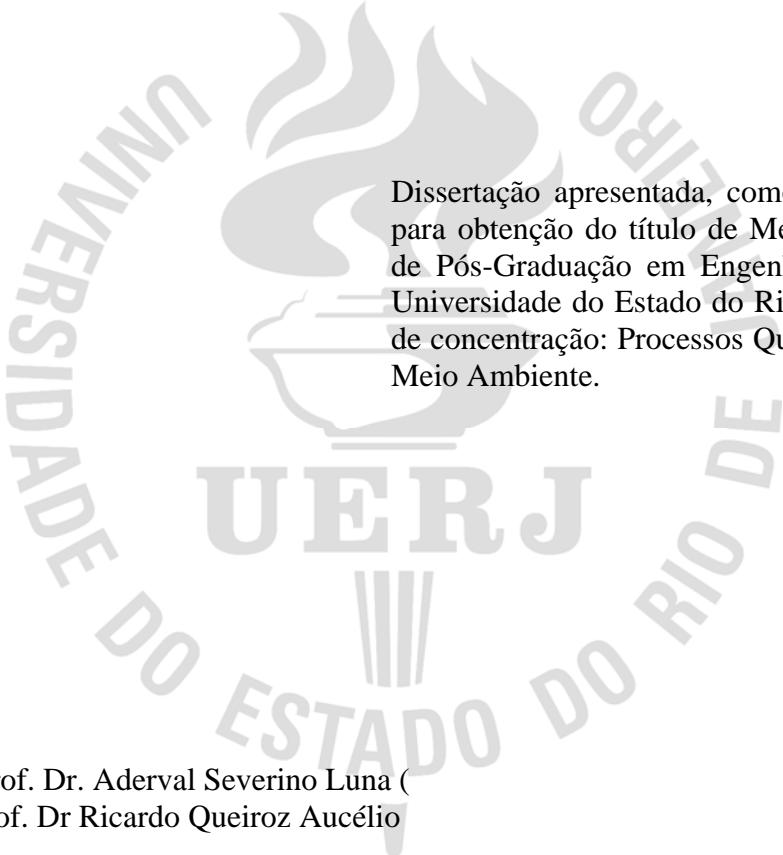
Thaís Malcher dos Santos Costa

**Aplicação e calibração multivariada de ordem superior na
resolução de espectros de fluorescência molecular para
quantificação de levofloxacino**

Rio de Janeiro
2009

Thaís Malcher dos Santos Costa

Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para a quantificação de levofloxacino



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Aderval Severino Luna (
Prof. Dr Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

C837

Costa, Thais Malcher dos Santos.

Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para a quantificação de levofloxacin. / Thais Malcher dos Santos Costa. - 2009.

104 f.

Orientador : Aderval Severino Luna.

Orientador : Ricardo Queiroz Aucélio.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Calibração multivariada - Teses. 2. Levofloxacin – Teses. 3. Medicamentos – Teses. 4. Fluorescência – Teses. I. Luna, Aderval Severino. II. Aucélio, Ricardo Queiroz. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU543.42

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Thaís Malcher dos Santos Costa

Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para a quantificação de *levofloxacino*

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação, do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 14 de agosto de 2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr Ricardo Queiroz Aucélio (Orientador)
Departamento de Química da PUC

Prof. Dra. Cristiane Assumpção Henriques
Instituto de química da UERJ

Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira
Departamento de Química da PUC

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Instituto de Química da UNB

Rio de Janeiro
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força e perseverança para chegar até aqui, também por ter me proporcionado bons momentos e amigos no mestrado, que levarei no meu coração para sempre.

Aos meus pais que, com todo o amor, sempre investiram em mim e me apoiaram em meus projetos. Que me ensinaram que o conhecimento é o maior bem que posso ter, me ajudaram na aquisição deste bem e a quem espero orgulhar sempre.

Aos meus avôs, por todo o amor e ternura que recebi. Em especial minha vó Petrô, que é minha grande amiga, sempre com palavras doces e orações pensando em mim.

Ao meu irmão, que é um presente que a vida me deu (e que eu sempre pedi), meu ombro amigo, conselheiro e parceiro, sem deixar de ser o caçula que tanto protejo e admiro.

Ao Carlos, por todo seu apoio, paciência e amor, que me ajudaram demais nesta reta final.

Ao professor Aderval Severino Luna, por tantos anos de orientação e por acreditar sempre em mim. Você é o melhor orientador que eu poderia ter, espero ter te orgulhado mais uma vez.

Ao professor Ricardo Queiroz Aucélio, pela orientação dada e por me receber tão bem na PUC.

Aos professores membros da banca, pela atenção dispensada ao meu trabalho. Em especial a Alessandra Licursi Maia Cerqueira, que também me recebeu muito bem na PUC e ao Jez Willian Batista Braga, pela ajuda na calibração.

Aos meus amigos (não só colegas) de laboratório: Arnaldo Peixoto, Igor Lima, Miguel Mocherniuk, Jéssica Pinho, Jéssica de Luca, Thais Chelo, Diego Barros, Otávio Bernardes e Marcelo Reis pelo companheirismo, paciência e piadas, e por sempre fazerem do laboratório um animado ambiente de trabalho

Ao Arnaldo Peixoto pela imensa ajuda e apoio. Agradeço-te hoje e sempre agradecerei do fundo do coração.

A todos os meus amigos, pela paciência e compreensão quando não pude estar presente.

Aos funcionários do Instituto de Química da UERJ, em especial Denise Cândido e Marize Araújo. Obrigada pela ajuda quando mais precisei, minhas amigas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

COSTA, Thaís Malcher dos Santos. *Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para a quantificação de levofloxacino*. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Levofloxacino é uma fluorquinolona sintética de 3ª geração. É eficaz contra uma variedade de infecções, incluindo o trato respiratório superior e inferior, trato urinário, obstétrico, ginecológico, e infecções dermatológicas. Com o objetivo de quantificar o levofloxacino em medicamentos e amostras de pacientes saudáveis e ter a resolução de seu espectro, foram realizados estudos preliminares em medicamento utilizando espectrofluorescência molecular com concentrações na faixa de 28,8 – 108 ng/mL e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na faixa de concentração de 2,9 – 10,8 µg/mL; e também quantificação em urina de paciente em tratamento com o medicamento, usando os dois métodos citados. Após isso, foram feitos estudos conclusivos utilizando espectrofluorescência molecular e os métodos univariado e PLS para determinação de levofloxacino na faixa de concentração de 0 – 250 ng/mL e PARAFAC combinado com o método da adição de padrão, para quantificação de levofloxacino em urina de paciente saudável, na faixa de concentração de 0 – 150 ng/mL, com diluição da amostra em três níveis (100 x, 500 x e 1000x). O método de ordem zero se mostrou mais eficiente na determinação de levofloxacino em medicamento que o de primeira ordem, seus desvios padrão foram 2,0% e 7,9%, respectivamente. Já o PARAFAC com o método de adição de padrão apresentou melhores resultados com a urina, pois possibilitou a quantificação do antibiótico em uma amostra complexa, de forma mais precisa e exata com o aumento da diluição da urina, sem necessidade de tratamento prévio.

Palavras-chave: Calibração multivariada. Levofloxacino. Medicamentos. Fluorescência

ABSTRACT

Levofloxacin is a 3rd generation fluorquinolone. It's effective against a large variety of infections, including respiratory, urinary, obstetric, gynecological tracts and cutaneous infections. In order to quantify levofloxacin in drugs and samples of healthy patients and have the resolution of its spectrum, were carried out preliminary studies in molecular medicine using molecular fluorescence spectroscopy, with concentrations ranging from 28.8 - 108 ng/mL and high performance liquid chromatography (HPLC) in the concentration range 2.9 – 10.8 $\mu\text{g/mL}$; and also quantified in urine of patients treated with the drug, using the two mentioned methods. After that, there have been conclusive studies using molecular fluorescence spectroscopy and univariate and PLS methods for determination of levofloxacin in the concentration range from 0 - 250 ng / mL and PARAFAC combined with the method of standard addition for quantification of levofloxacin in urine of healthy patient, in the concentration range from 0 – 150 ng/mL, diluting the sample into three levels (100 x, 500 x e 1000x). The zero-order method was more efficient in the determination of levofloxacin in medicine that the first order, their standard deviations were 2.0% and 7.9% respectively. However, the PARAFAC with the method of standard addition showed better results in urine, since it allowed quantification of the antibiotic in a complex sample, in a more precise and accurate way, with increasing dilution of the urine, without prior treatment.

Keywords: Multivariate calibration. Levofloxacin. Drugs. Fluorescence

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	10
1 FLUORQUINOLONAS E URINA.....	12
1.1 Levofloxacino.....	15
1.2 Urina.....	16
2 ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA MOLECULAR.....	17
2.1 Luminescência molecular.....	17
2.1.1 <u>Regra de Kasha</u>	19
2.2 Características e vantagens das técnicas fluorescentes.....	20
2.3 Fluorescência x fosforescência.....	21
2.4 Instrumentação da espectrofotometria de fluorescência molecular.....	23
2.5 Fluoróforos.....	25
2.6 Fatores que afetam a fluorescência.....	27
2.6.1 <u>Temperatura</u>	27
2.6.2 <u>Polaridade do solvente</u>	29
2.6.3 <u>Concentração</u>	31
2.6.4 <u>Atenuação de fluorescência: “Quenching”</u>	32
2.7 Relações quantitativas importantes	32

3 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	36
3.1 Introdução.....	36
3.2 Modelos de calibração de ordem zero.....	39
3.3 Mínimos quadrados parciais – PLS.....	40
3.4 Métodos quimiométricos de segunda ordem.....	42
3.4.1 <u>Análise de fatores paralelos (PARAFAC)</u>	43
4 MÉTODO DA ADIÇÃO DE PADRÃO	48
5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE LEVOFLOXACINO	50
5.1 HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)	50
5.2 Quimioluminescência.....	51
5.3 Espectrofluorimetria.....	51
5.4 Eletroforese capilar.....	52
5.5 Outros métodos.....	52
6 VALIDAÇÃO DOS MODELOS	53
6.1 Estudo da linearidade do método.....	53
6.2 Precisão.....	54
6.3 Exatidão.....	54
7 MATERIAIS E MÉTODOS	55
7.1 Reagentes.....	55
7.2 Instrumentação.....	55
7.2.1 <u>Espectrofluorímetro</u>	55
7.2.2 <u>HPLC</u>	56
7.2.3 <u>Equipamentos auxiliares</u>	57
7.2.3.1 Balança analítica.....	57
7.2.3.2 Banho ultrassônico.....	57

7.2.3.3 Micropipetas.....	57
7.3 Procedimentos.....	57
7.3.1 <u>Lavagem do material</u>	57
7.3.2 <u>Preparação dos padrões</u>	57
7.3.2.1 Solução estoque de levofloxacino 100 µg/mL.....	58
7.3.2.2 Formulações farmacêuticas e urina.....	58
7.4 Procedimento para medição no espectrofluorímetro.....	58
8 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
8.1 Estudos Preliminares.....	59
8.1.1 <u>Determinação de levofloxacino em medicamento</u>	59
8.1.1.1 Estudo da linearidade do método.....	61
8.1.1.1.2 Determinação com o medicamento contendo levofloxacino.....	61
8.1.1.2 Método por HPLC.....	63
8.1.1.2.1 Linearidade.....	65
8.1.1.2.2 Determinação com o medicamento contendo levofloxacino.....	66
8.1.1.3 Comparação dos métodos.....	68
8.1.1.3.1 Levofloxacino padrão.....	68
8.1.1.3.2 Levofloxacino no medicamento.....	69
8.1.2 <u>Urina de paciente</u>	71
8.1.2.1 Quantificação por fluorescência molecular.....	71
8.1.2.2 Quantificação por HPLC.....	71
8.1.2.3 Comparação dos métodos.....	73
8.2 Estudos conclusivos.....	73
8.2.1 <u>Método univariado</u>	73
8.2.1.1 Método univariado utilizando medicamento.....	75
8.2.2 <u>PLS</u>	77
8.2.3 <u>Determinação de levofloxacino em urina</u>	78
8.2.3.1 Urina enriquecida com levofloxacino (“spiking”).....	78

9 CONCLUSÃO	93
10 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	95
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	96
ANEXO A - Trabalho apresentado no Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA 2009).....	103
ANEXO B - Trabalho apresentado no ENQA 2009.....	104

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O levofloxacino é uma fluorquinolona sintética de 3ª geração (Santoro *et al.*, 2006), muito utilizada no tratamento de infecções nos tratos respiratório superior e inferior, urinário, obstétrico, ginecológico, e em infecções dermatológicas. Sua principal forma de excreção é na urina (Wong, Juzwin e Flor, 1997), uma matriz rica em diversos componentes, como proteínas, vitaminas, medicamentos e até toxinas.

A molécula de levofloxacino possui ligações insaturadas conjugadas e rigidez estrutural suficiente para apresentar o fenômeno de fluorescência molecular (Lakowicz, 2006) e por isso, pode ser quantificada por espectrometria de fluorescência molecular. Quando esta quantificação é realizada em amostras pouco complexas, como medicamentos, não há interferentes. O problema surge quando se resolve quantificar o levofloxacino excretado em um paciente em tratamento pelo antibiótico, pois a urina, com suas muitas substâncias que também fluorescem, se mostra um grande interferente. Os espectros do levofloxacino e dos interferentes da urina aparecem sobrepostos, o que impossibilita a quantificação do primeiro, usando somente a espectrometria de fluorescência molecular.

A calibração univariada (de ordem zero) é utilizada em amostras pouco complexas, nas quais não há a presença de interferentes. A calibração multivariada possibilita a quantificação e determinação de um analito em presença de outros, sem a necessidade de retirada dos interferentes ou de outros tratamentos da amostra (Brooksh e Kowalski, 1994), além de proporcionar maior rapidez, redução do uso de reagentes e redução dos erros causados pela manipulação das amostras.

Por isso, optou-se neste trabalho pela calibração de ordem zero, pelos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para a determinação de levofloxacino em medicamentos e pela Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) para a quantificação do mesmo antibiótico em urina.

Outro método bastante utilizado quando se tem matrizes complexas e efeitos de matriz, é o método da adição de padrão. Este se baseia em adicionar um ou mais incrementos de uma solução padrão a alíquotas de mesmo volume da amostra, e é conhecido como “spiking” (Skoog, Holler e Nieman, 2002). Para a determinação do

levofloxacino foi necessário a combinação do PARAFAC e o método da adição de padrão (SOSAM – second order standard addition method) para a deconvolução do espectro do antibiótico, seguido de sua quantificação.

Este trabalho tem como objetivo quantificar o levofloxacino em medicamentos e amostras de pacientes saudáveis e resolução de seu espectro, usando para isto calibração de ordem zero, calibração de 1^a. ordem e calibração multivariada de 2^a. ordem combinada com adição de padrão. Para isto, serão realizados:

1- Estudos preliminares visando à determinação de levofloxacino:

a) em medicamento utilizando fluorescência molecular com concentrações na faixa de 28,8 – 108 ng/mL e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na faixa de concentração de 2,9 – 10,8 µg/mL;

b) em urina de paciente em tratamento com o medicamento, também usando os dois métodos, de fluorescência molecular e HPLC;

2- Estudos conclusivos:

com espectrofluorescência molecular, pelos métodos:

a) Univariado (ordem zero): Para determinação de levofloxacino em medicamento, na faixa de concentração de 0 – 250 ng/mL;

b) PLS (1^a. ordem): Para determinação de levofloxacino em medicamento, com concentrações entre 0 – 250 ng/mL;

c) PARAFAC combinada com o método da adição de padrão: Para quantificação de levofloxacino em urina, de paciente saudável, na faixa de concentração de 0 – 150 ng/mL, com diluição da amostra em três níveis (100 x, 500 x e 1000 x).

1 FLUORQUINOLONAS E URINA

As quinolonas fazem parte de uma família de fármacos utilizados como antibióticos. Atualmente fazem parte de uma das maiores classes de agentes antimicrobianos e, por isso, são utilizadas no mundo todo no tratamento de infecções de origem bacteriana e as suas indicações terapêuticas evoluíram da aplicação em infecções urinárias a aplicações em infecções em quase todo o corpo.

Estes fármacos são agentes antibacterianos sintéticos utilizados extensivamente tanto em medicina como em medicina veterinária e são armas importantes no combate a organismos Gram (-), Gram (+). As últimas gerações destes agentes chegam mesmo a ser ativas contra bactérias anaeróbias (Sousa, 2007).

A coloração de Gram é um método que permite distinguir as bactérias que podem ser classificadas em Gram (+) e Gram (-), com base na composição da sua parede celular. A parede celular das bactérias Gram (+) é constituída por uma única membrana e o seu constituinte principal é o peptidoglicano (heteropolímero rígido e insolúvel em água). Em contraste, a parede celular das bactérias Gram (-) é constituída por duas membranas (uma interna e uma externa). A membrana externa é constituída por várias proteínas e lipopolisacarídeo (macromolécula), enquanto a membrana interna é fundamentalmente constituída pelo peptidoglicano (Sousa, 2007).

As quinolonas surgiram acidentalmente como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de atividade antibacteriana conhecida e comprovada, a cloroquina. No entanto, este produto secundário revelou possuir, também, atividade antimicrobiana surgindo assim, no início da década de 60, a primeira quinolona: o 1-3 Ácido Nalidíxico.

O Ácido Nalidíxico (1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico) é um derivado das 1,8-naftiridinas (ou 4-quinolonas) que foi limitado, originalmente, ao tratamento de infecções urinárias devido ao seu espectro de ação restrito, a ele possuir uma pobre difusão para os tecidos e por problemas de toxicidade cardíaca e ao sistema nervoso central. Com o crescente número de bactérias resistentes à sua atividade, o uso do ácido nalidíxico rapidamente entrou em declínio surgindo, deste modo, a necessidade da obtenção de novas substâncias.

Embora o ácido nalidíxico tenha entrado em desuso, suas características ainda estão presentes nas novas substâncias. A estrutura desses antibióticos é baseada num núcleo 4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxilo e, devido à complexidade da nomenclatura, eles são geralmente designados de 4-quinolonas (referência ao oxigênio exocíclico na posição 4) (SOUSA, 2007).

Na década de 80, a atividade das quinolonas aumentou consideravelmente por adição de um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinil na posição 7 do seu núcleo, dando origem a uma nova classe de substâncias designada de fluoroquinolonas (ou quinolonas de segunda geração) (Salem, 2005). Esta combinação levou a um maior espectro de ação, a um aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana levando, conseqüentemente, a uma melhor atividade contra bactérias Gram (-), passando a abranger, também, algumas espécies Gram (+) (SOUSA, 2007).

Há uma preocupação quanto à possibilidade dos patógenos humanos desenvolverem resistência aos antibióticos após exposição a baixas concentrações destes fármacos (Mandell, Peterson, Wise, Hooper, Low, Shaad, Klugman e Courvalin, 2002).

A figura 1 representa a classificação das quinolonas nas várias gerações, com base no seu espectro de ação.

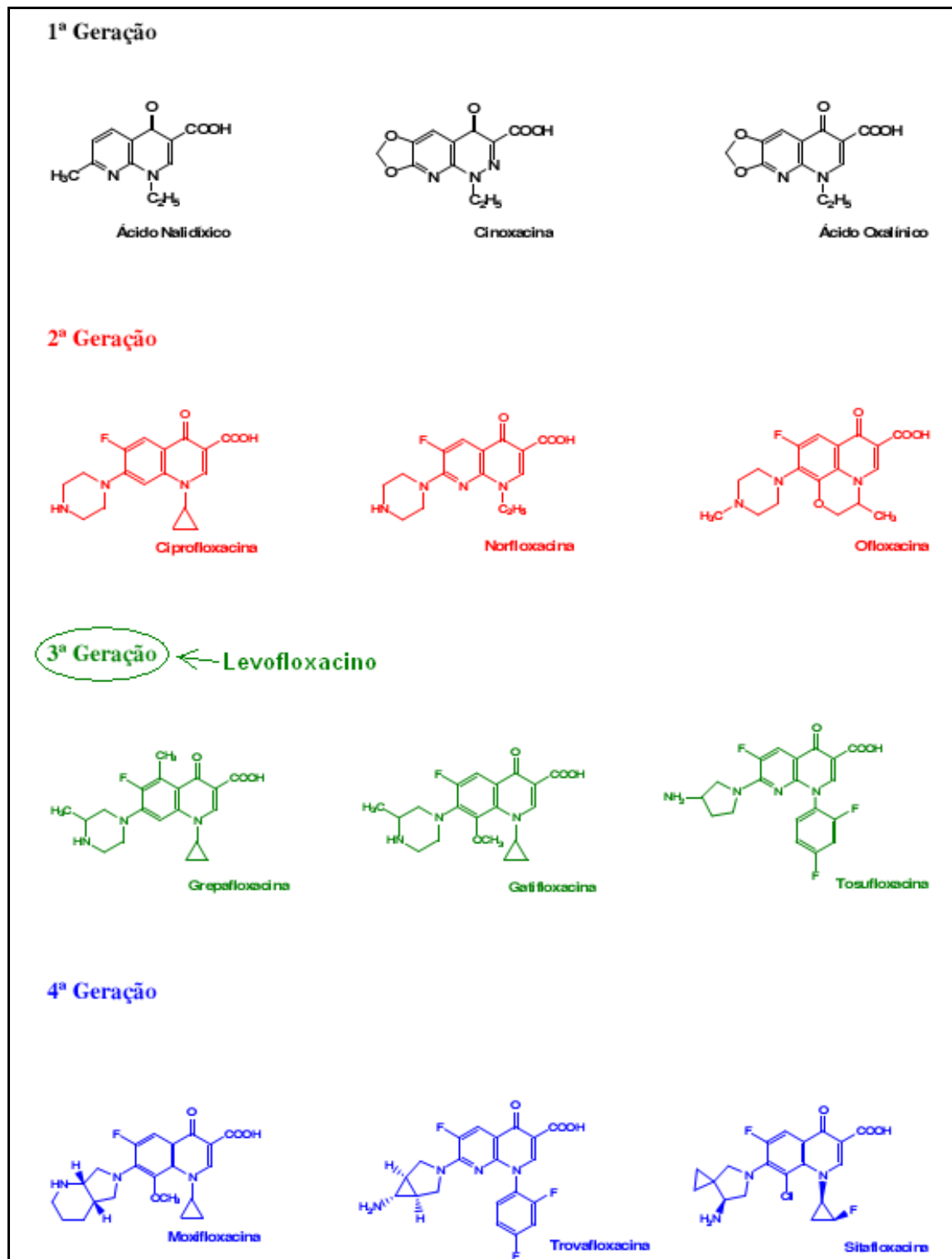


Figura 1: Evolução das quinolonas: as diferentes gerações (Andriole, 2000).

1.1 Levofloxacino

O levofloxacino, uma fluorquinolona sintética da 3^a geração (Santoro *et al.*, 2006), usada como agente antibacteriano oral, é isômero óptico da ofloxacina e *in vitro*, é geralmente duas vezes mais potente que este.

A penetração da droga nos tecidos e fluidos corporais é rápida e esta se difunde logo após a administração oral. O levofloxacino é eficaz contra uma variedade de infecções, incluindo o trato respiratório superior e inferior, trato urinário, obstétrico, ginecológico, e infecções dermatológicas (Tsai, Bair, and Hu, 2007).

Em estudos comparativos com a ofloxacina, o levofloxacino mostrou uma eficácia equivalente a esta e, utilizando apenas metade da dosagem diária utilizada pela primeira, apresentou uma redução na incidência de efeitos colaterais no tratamento do trato respiratório inferior e em infecções complicadas no trato urinário (Davis e Bryson, 1994).

Sua dosagem terapêutica é de 500 mg por dia (González, Mochón e La Rosa, 2005). Segundo Wong, Juzwin e Flor, 1997, o antibiótico sofre metabolismo limitado e é eliminado praticamente sem sofrer modificações. No período de 24 horas de administração oral, cerca de 80 - 85% da droga intacta são recuperados na urina e aproximadamente 2% nas fezes. Os principais metabólitos presentes da urina, desmetil – levofloxacino e N-óxido de levofloxacino são responsáveis por 2% da dose excretada, cada.

É uma substância sólida, sem odor, amarelada e com ponto de fusão igual a 228,6°C. É praticamente insolúvel em água, mas é solúvel em etanol e clorofórmio, e também na mistura água-etanol (González, Mochón e Rosa, 2000).

A figura 2 mostra a fórmula estrutural do levofloxacino.

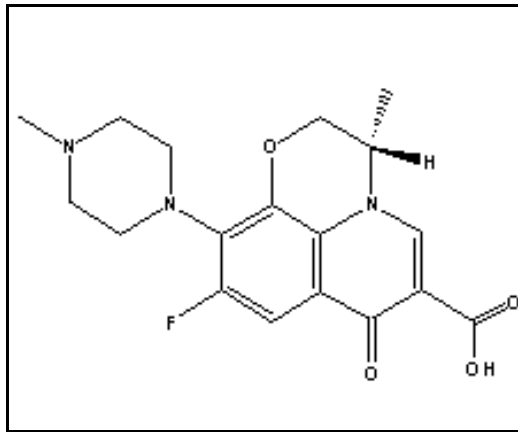


Figura 2: Levofloxacino

URINA

A urina foi escolhida para este trabalho por ser uma importante matriz biológica, alvo de vários estudos e também, devido ao problema de interferência que esta matriz exerce sobre os analitos que coexistem com ela em uma solução. A presença de substâncias que fluorescem, fazem com que os sinais analíticos de fluorescência dos demais analitos sejam denegridos pelo da urina.

Algumas substâncias que fluorescem e podem estar presentes na urina são:

- Substâncias endógenas (originadas pelo próprio organismo): Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida e porfirinas;
- Substâncias vindas de medicamentos e cosméticos: fluoresceína;
- Substâncias vindas de medicamentos: indometacina, triamtereno e outras;
- Substâncias originadas de toxinas: dinitrofenol, rodamina, aflatoxina, palmotoxina e outras (Casavant, Shah e Battels, 2001).

2 ESPECTROMETRIA DE LUMINESCÊNCIA MOLECULAR

2.1 Luminescência molecular

Fluorescência é a radiação emitida durante a transição radiativa de uma molécula do estado excitado singleto para o estado fundamental (singleto) (Lakowicz, 2006). Este fenômeno foi observado pela primeira vez em 1565 e seu nome se deve ao fato do mineral fluorita brilhar quando exposto à radiação UV. A principal diferença entre a fluorescência e os demais tipos de fotoluminescência é o fato de que as moléculas excitadas voltam ao estado fundamental imediatamente após a excitação, num tempo que é da ordem de 10^{-8} s (Rendell, 1987).

Os processos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz são usualmente ilustrados pelo Diagrama de Jablonski, que pode ser observado na figura 3. Os diagramas de Jablonski são utilizados como ponto inicial na discussão de absorção e emissão de radiação eletromagnética. São usados em uma variedade de formas, com a finalidade de ilustrar vários processos moleculares que podem ocorrer no estado excitado.

O estado fundamental singleto e os níveis de energia são representados por S_0 e S_n . Em cada um dos desses níveis eletrônicos de energia os fluoróforos podem existir em uma quantidade de níveis de energia vibracional descritos por 0,1, 2,...n. Os processos que podem ocorrer são representados e explicados a seguir.

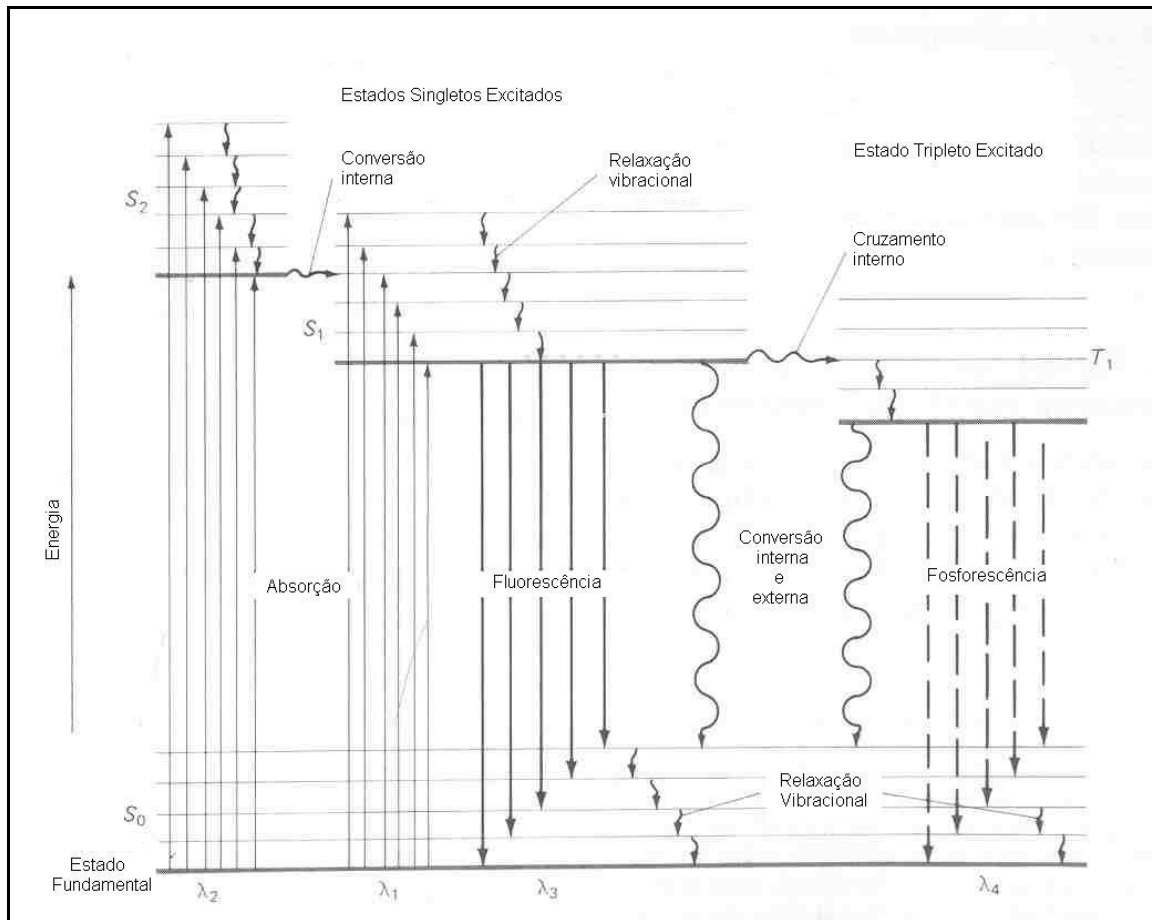


Figura 3: Diagrama de Jablonski (Mendham *et al.*, 2002)

- **Absorção:** Excitação da população de moléculas de um nível de energia mais baixo (em geral o fundamental) para um nível eletrônico excitado de caráter singleto ($S_0 \rightarrow S_n$).
- **Conversão interna (CI):** desativação não radiativa que ocorre a ordem de tempo de 10^{-13} a 10^{-12} s. A energia absorvida pela interação com o fóton é dissipada na forma de calor. Pode ocorrer devido à vibração molecular ou a colisão com moléculas de solvente;
 - **Fluorescência (F):** Desativação radiativa que ocorre na ordem de tempo de 10^{-10} a 10^{-6} s. Transição entre estados de mesma multiplicidade ($S_1 \rightarrow S_0$);
 - **Fosforescência (P):** Desativação radiativa que ocorre na ordem de tempo de 10^{-4} a 10^{-1} s. Transição entre estados de multiplicidades diferentes ($T_1 \rightarrow S_0$);

- **Cruzamento intersistemas (CIS):** Transição não-radiativa que ocorre na ordem de tempo de 10^{-7} s e que envolve troca de multiplicidade do estado excitado –ou seja, o elétron tinha a orientação de spin singleto e esta orientação é invertida para tripleto.

Observação: Não se deve confundir conversão interna com fluorescência e fosforescência. O que explica a diferença entre o primeiro e os fenômenos luminescentes é a **Regra de Kasha**.

2.1.1 Regra de Kasha

É uma propriedade importante da fluorescência, que diz que o espectro de emissão é observado de forma especular no comprimento de onda de excitação, como mostra a figura 4. A natureza geralmente simétrica desses espectros é o resultado das mesmas transições envolvidas, tanto na absorção quanto na emissão, e à similaridade dos níveis de energia vibracional em S_0 e S_1 . Uma vez que o fluoróforo é excitado até os níveis de energia eletrônica e vibracional mais altos possíveis, este excesso de energia é rapidamente dissipado, até que o fluoróforo ocupe o menor nível vibracional de S_1 .

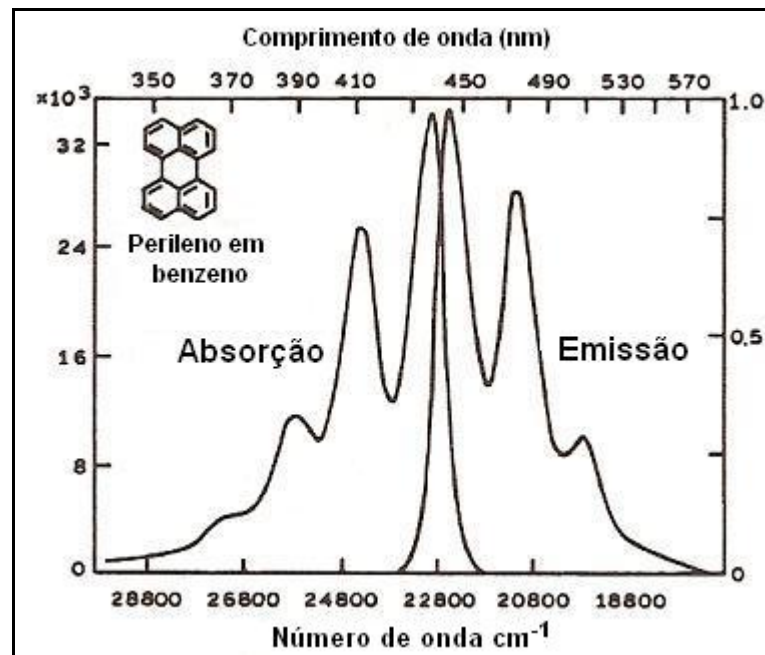


Figura 4: Espectros de fluorescência do perileno (Lakowicz, 2006)

A dissipação desse excesso de energia, que é um tipo de cruzamento interno, ocorre na ordem de 10^{-12} s, e presume-se que é o resultado de uma forte sobreposição de numerosos estados de energias parecidas. Devido a esta rápida relaxação, o espectro de emissão costuma ser independente do de excitação (Lakowicz, 2006).

Cabe ressaltar então, que a desativação radiativa só ocorre a partir do primeiro nível vibracional do primeiro estado excitado singlete ou tripleto. Fato provado com base na diferença de velocidade dos processos fluorescência e fosforescência em relação à conversão interna.

2.2 Características e vantagens das técnicas fluorescentes

As principais técnicas fluorescentes baseiam-se em características como intensidade, espectro, tempo de vida e polarização para identificação e quantificação da substância de interesse, que pode luminescer naturalmente, ou ser induzida a isso.

As vantagens da fluorescência são: baixo custo de manutenção e análise, pois os equipamentos necessários são relativamente mais baratos que os empregados por

outras técnicas analíticas, tais como HPLC. Os métodos geralmente demandam pequena quantidade de amostra – cerca de 3 mL – o que também faz com que o volume do descarte seja pequeno. Além das vantagens anteriores, a técnica também tem grande sensibilidade, o que possibilita análise a nível traço e alta seletividade, que permite que se faça análises rápidas de amostras complexas.

2.3 Fluorescência x fosforescência

A luminescência é dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, e elas dependem da natureza do estado excitado. No estado excitado singlete, o elétron do orbital excitado está pareado - ou seja, seu spin está em sentido oposto – com o elétron que é seu par no estado fundamental, como mostra a fileira do meio da figura 3. Conseqüentemente, o retorno deste elétron ao estado fundamental é permitido pela mecânica quântica e ocorre rapidamente com a emissão de um fóton. Como foi dito anteriormente, as taxas de emissão da fluorescência são tipicamente 10^{-8} s, então, o tempo de vida típico de uma fluorescência é próximo de 10 ns. (Lakowicz, 2006).

Fosforescência é a emissão de radiação eletromagnética do estado excitado tripleto (representado na terceira fileira da figura 5), no qual o elétron do orbital excitado se encontra com a mesma orientação de spin (ambos estão no mesmo sentido) do seu par no estado fundamental. Essas transições para o estado fundamental não são permitidas pela mecânica quântica, e as taxas de emissão são lentas, da ordem de 10^{-3} a 10^0 s. Logo, o tempo de vida de uma fosforescência é de milisegundos a segundos.

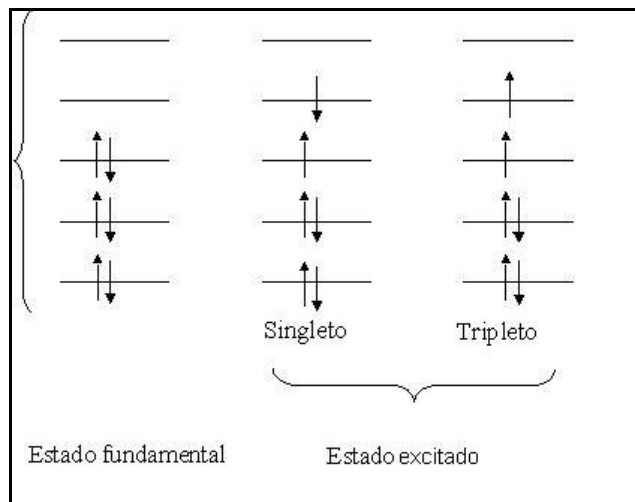


Figura 5: Representação dos estados excitados singlete e tripleto. (Lakowicz, 2006)

Quando se observa brinquedos ou outras substâncias que “brilham no escuro”, trata-se do fenômeno da fosforescência, no qual estas substâncias brilham por alguns segundos, enquanto os fosforóforos excitados retornam lentamente para o estado fundamental.

Enquanto a fluorescência em substâncias líquidas pode ser facilmente observada à temperatura ambiente, o mesmo não acontece com a fosforescência. Isso se deve ao fato de existirem vários processos de desativação que competem com a emissão, como decaimento não-radiativo e processos de atenuação da fluorescência (“quenching”), que serão abordados na seção 1.6.4.

2.4 Instrumentação da espectrofotometria de fluorescência molecular

A instrumentação básica da espectrofotometria de fluorescência é composta por três diferentes tipos de dispositivos:

1. Fonte de luz:
 - Lâmpadas de arco emissivo (contínuo);
 - Lâmpadas pulsadas; ou
 - Lasers pulsados
2. Seletor de comprimento de onda (são utilizados dois seletores):
 - Filtros de passagem de banda; ou
 - Monocromadores
3. Detector (sensível no UV - visível ou no UV- visível- Infravermelho Próximo):
 - Tubos fotomultiplicadores (um canal) – equipamentos de varredura; ou
 - Arranjo de fotodiodos (multicanal).

Enquanto os dispositivos da espectrofotometria de absorção são colocados todos a 180° para detecção da radiação transmitida- que é a radiação que o analito não absorveu -, o arranjo dos dispositivos de luminescência é feito em 90° , para que haja detecção da radiação transmitida (que é a fluorescência do próprio analito), com o mínimo possível de ruído ocasionado pela radiação de fundo, neste caso, a radiação que incide no analito.

Em um espectrômetro de luminescência ideal, a fonte de excitação deve ser intensa e prover uma radiância constante no intervalo de comprimentos de onda de excitação; os monocromadores devem permitir a passagem de radiação em todos os comprimentos de onda com a mesma eficiência e devem ser independentes da polarização. Por fim, o detector deve detectar todos os comprimentos de onda de emissão com a mesma eficiência (Lakowicz, 2006).

A figura 6 mostra o diagrama básico de um espectrômetro de luminescência. Observa-se que nele há dois monocromadores e que a aquisição da radiação foi feita em ângulo, a fim de se minimizar o espalhamento de segunda ordem.

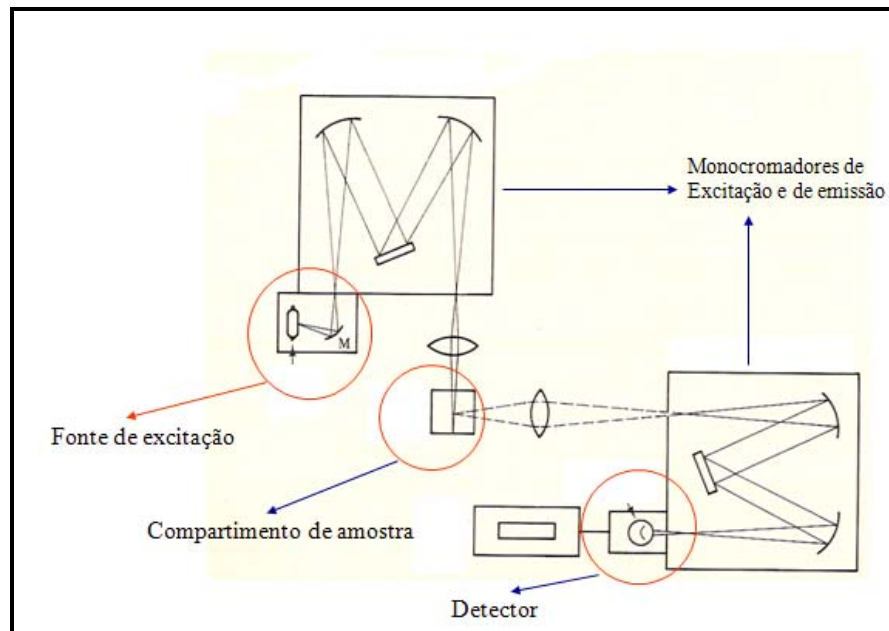


Figura 6: Espectrômetro de Luminescência. (Lakowicz, 2006)

As cubetas utilizadas no aparelho são de quartzo de boa qualidade (as de má qualidade podem vir a fluorescer). Deve-se ter cuidado para que elas não sejam arranhadas, pois isso também gera ruídos, que prejudicam a detecção da fluorescência.

As cubetas devem proporcionar reposição de amostra de maneira simples e reprodutiva. Sua geometria deve visar à minimização de espalhamento e de fluorescência da cubeta.

2.5 Fluoróforos

Fluoróforos são substâncias moleculares que apresentam ligações insaturadas conjugadas (têm elétrons π deslocalizados) e que apresentam rigidez estrutural, seja ela natural ou provida por uma matriz. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) não perdem energia vibracional, logo têm uma redução significativa do processo de desativação não-radiativo por conversão interna, com consequente aumento da eficiência quântica luminescente (ϕ_L). Já uma estrutura molecular planar favorece a luminescência, pois aumenta a interação e conjugação entre o sistema de elétrons π .

Os fluoróforos podem ser divididos em dois grupos: os intrínsecos e os extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são os que apresentam fluorescência naturalmente e serão abordados neste trabalho, os extrínsecos são adicionados ao analito de interesse para que haja fluorescência quando este não a apresenta, ou para mudar as propriedades espectrais da amostra. (Lakowicz, 2006)

A eficiência luminescente de uma molécula (ϕ_L) depende de sua estrutura e do meio em que ela se encontra. Embora seja difícil prever se uma molécula exibirá fluorescência, algumas regras gerais podem ser observadas:

- Fluorescência não é usualmente observada em moléculas saturadas onde não existem elétrons π ;
- Este fenômeno é raramente observado em moléculas alifáticas. Em alguns casos, moléculas alifáticas com sistemas conjugados, como o beta-caroteno e a vitamina A, exibem fluorescência devido a transições $\pi \rightarrow \pi^*$;
- Também pode-se observar fluorescência intensa em moléculas contendo heteroátomos, como nitrogênio, oxigênio e enxofre. Isso se justifica pelo fato de grupos substituintes nos sistemas aromáticos afetarem grandemente as características luminescentes das moléculas da seguinte maneira:

Os grupos doadores de elétrons: aumentam a fluorescência

Os grupos atratores de elétrons: diminuem a fluorescência.

- Sistemas heterocíclicos simples não apresentam luminescência em solução. Apenas quando estes sistemas são conjugados com pelo menos um anel aromático.

A figura 7 mostra exemplos de moléculas que apresentam fluorescência:

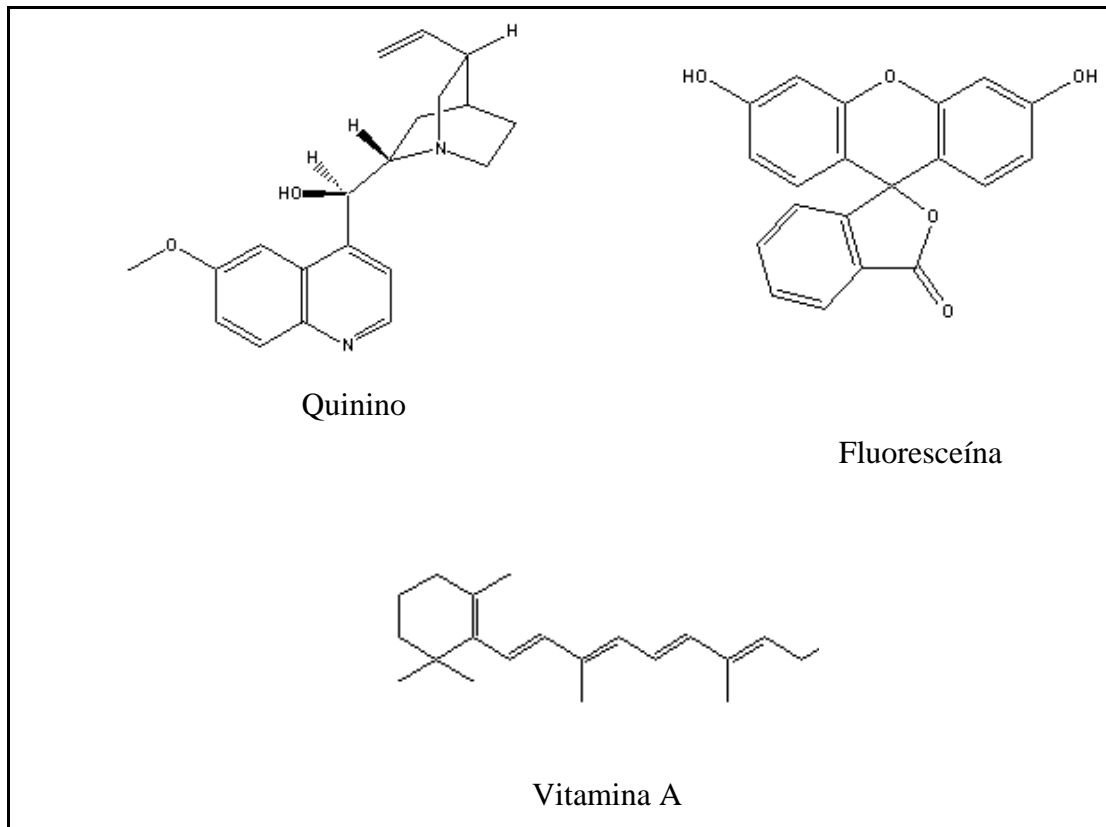


Figura 7: Moléculas de Quinino, Fluoresceína e Vitamina A.

Os fluoróforos extrínsecos induzem a luminescência em moléculas naturalmente não-luminescentes através de reações de derivatização, estas reações modificam a estrutura das moléculas e conseqüentemente, suas propriedades físico-químicas, obtendo-se assim, um derivado luminescente. Essas derivatizações podem ser feitas com agentes fluorogênicos ou fosfogênicos, com agentes oxidantes e redutores e após reações ácido-base. Também há a possibilidade de formação de quelatos com íons de terras raras e derivatização da molécula por meio de reações fotoquímicas. (Finete, 2005).

2.6 Fatores que afetam a fluorescência

Os dois fatores críticos na magnitude da eficiência quântica luminescente de uma substância (Φ_L) são a estrutura da molécula (discutida no item anterior) e o favorecimento ou não da desativação radiativa pelo meio onde que ela se encontra. (Finete,2005)

A eficiência quântica luminescente é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência (I_L) e o número de fótons absorvidos pela espécie química (I_A) (equação1). Se a eficiência quântica tiver magnitude entre 0,1 e 1, uma molécula será significativamente luminescente.

$$\frac{I_L}{I_A} \equiv \Phi_L \quad (1)$$

Os principais fatores ambientais que afetam a fluorescência de uma substância são: temperatura, pH, solvente e a presença de outras espécies. Estes fatores afetam as velocidades dos processos luminescentes e dos processos não-radiativos, assim como a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia (Schulman, 1977). Também será abordada neste trabalho, a influência da concentração do fluoróforo, fator de ordem experimental de interesse neste trabalho.

2.6.1 Temperatura

Em geral o aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional (CI) na desativação do estado excitado, porém, por ser um fenômeno com tempo de vida relativamente curto, esse fator é menos crítico no caso da fluorescência, o que permite fácil observação do fenômeno à temperatura ambiente. Isto que não ocorre no caso da fosforescência, pois

esta tem um tempo de vida maior e precisa de mecanismos de imobilização da molécula (Vo-Dinh,1984).

A redução da temperatura do solvente aumenta sua viscosidade, fazendo com que a reorientação das moléculas do solvente em torno do luminóforo seja mais lenta e logo a sua estabilização seja menos intensa (Lakowicz, 2006).

A figura 8 mostra um exemplo da influência da temperatura na fluorescência. Conforme a temperatura do propilenoglicol diminui, o espectro de emissão do Patman – o corante cloreto de 6- hexadecanoil- 2- (((2- (trimetilamônio) etil) metil) amino) naftaleno - se desloca para comprimentos de onda inferiores.

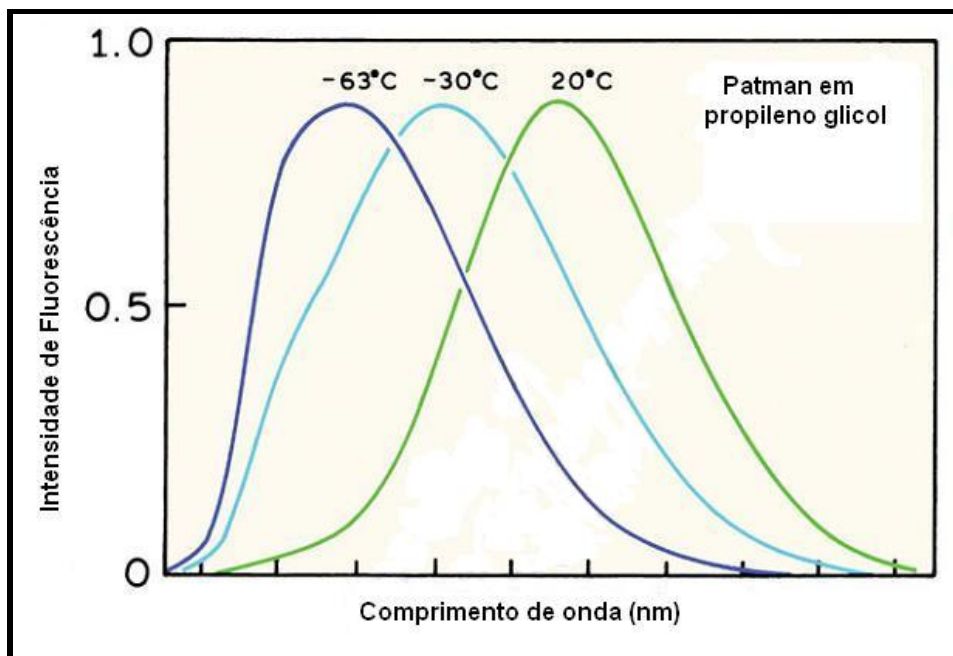


Figura 8: Influência da temperatura na fluorescência do Patman em propilenoglicol. (Lakowicz, 2006)

2.6.2 Polaridade do solvente

A emissão de radiação dos fluoróforos geralmente ocorre em comprimentos de onda maiores que os de absorção, esta perda de energia se deve à variedade de processos dinâmicos que ocorrem logo após a absorção de luz.

O fluoróforo é tipicamente excitado para o primeiro estado singlete (S_1) e o excesso de energia é rapidamente perdido pelo solvente. Se o fluoróforo é excitado para o segundo estado singlete (S_2), ele rapidamente decai para o estado S_1 em 10^{-12} s devido à conversão interna (Lakowicz, 2006).

O efeito do solvente desloca a emissão para um comprimento de onda de menor energia devido à estabilização do estado excitado pelas moléculas do solvente polar. Normalmente, o fluoróforo tem um momento de dipolo maior no estado excitado que no estado fundamental. Após a excitação, os dipolos do solvente podem reorientar ou relaxar o momento de dipolo do estado excitado, o que reduz a energia do fluoróforo, como mostrado na figura 9. À medida que a polaridade do solvente aumenta, este efeito se torna maior, resultando na emissão em energias menores ou em comprimentos de onda maiores.

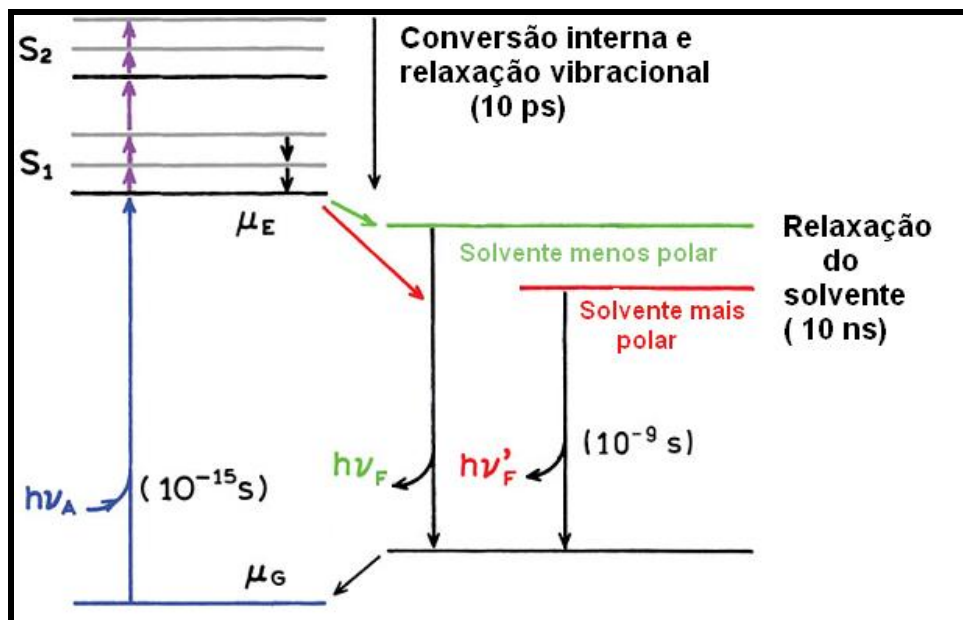


Figura 9: Representação do efeito do solvente na fluorescência. (Lakowicz, 2006)

Em geral, somente fluoróforos que são polares apresentam uma grande sensibilidade à polaridade dos solventes. Moléculas apolares, como hidrocarbonetos aromáticos não substituídos, são bem menos sensíveis à polaridade do solvente.

O tempo de meia-vida da fluorescência (1 a 10 ns) é usualmente muito maior que o tempo necessário para relaxação do solvente. Para solventes líquidos à temperatura ambiente, esta relaxação ocorre entre 10 e 100 ps. Por esta razão, os espectros de emissão dos fluoróforos são representados com o solvente no estado relaxado, como na figura 10 abaixo.

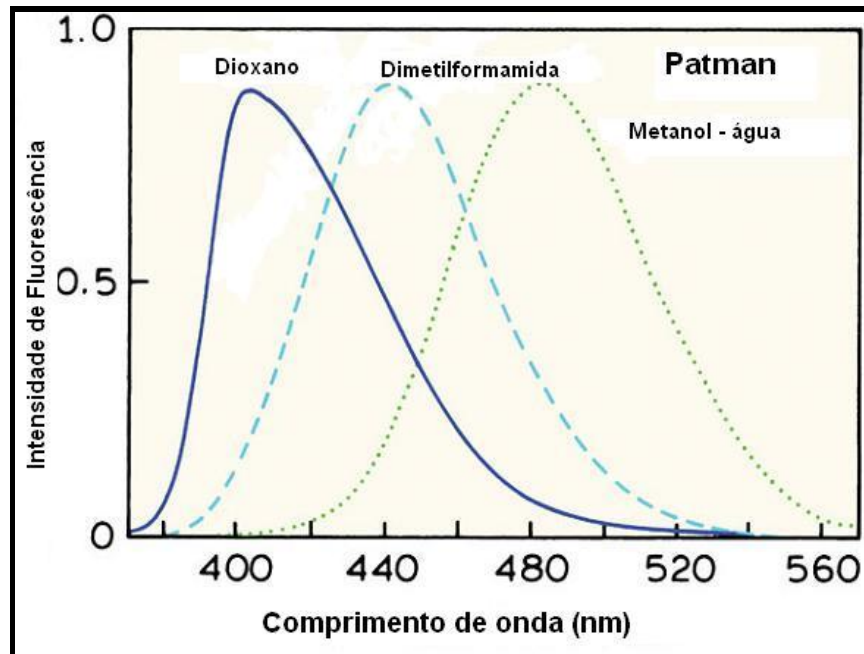


Figura 10: Influência do solvente na fluorescência do Patman em diferentes solventes (Lakowicz, 2006).

2.6.3 Concentração

Quando a concentração do luminóforo é relativamente alta, ela pode interferir na fluorescência com os efeitos de filtro. Eles provocam a perda da linearidade das curvas de resposta entre o sinal luminescente e concentração ou quantidade de analito (figura 11).

- No efeito pré-filtro, ocorre absorção da radiação de excitação pelo luminóforo ou algum interferente, antes que ela atinja o volume óptico amostrado;
- No efeito pós-filtro, ocorre a absorção da radiação de emissão, por parte do luminóforo ou de interferentes (isto é chamado auto absorção).

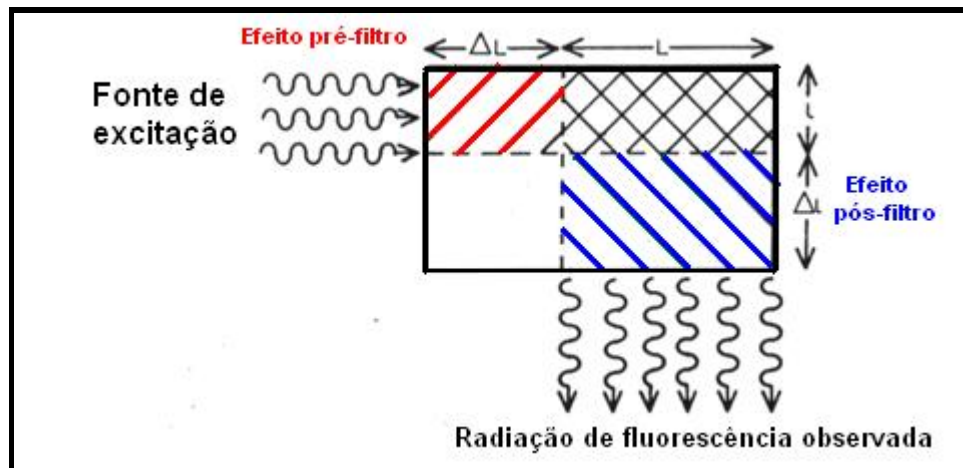


Figura 11: Efeitos de filtro (Lakowicz, 2006).

A perda de linearidade do sinal analítico também pode acontecer quando a concentração de fluoróforo é alta e ocorre supressão do sinal analítico (a radiação de emissão apresenta um sinal muito elevado e não-linear). Este problema é resolvido com a colocação de um filtro de densidade no detector do aparelho, o que faz com que o sinal analítico volte a ficar linear (Lakowicz, 2006).

2.6.4 Atenuação de fluorescência: “Quenching”

“Quenching” pode ser definido como transferência de energia, por processo não-radiativo, da substância luminescente no estado excitado (luminóforo) para outras moléculas, denominadas agentes desativadores, estes por sua vez, passam para o estado excitado enquanto o luminóforo retorna para o estado fundamental sem emitir radiação (Finete, 2005). O quenching dinâmico é um processo colisional e por isso requer contato com as espécies envolvidas. Em consequência disto, a magnitude desta desativação é proporcional à concentração do agente desativador e da sua capacidade de difusão no meio. Substâncias concomitantes, presentes em maiores concentrações podem também reduzir a luminescência líquida emitida por uma população de fluoróforos por meio da reabsorção da fluorescência (efeito de filtro).

Uma grande variedade de substâncias pode atuar como atenuador, ou “quencher” da fluorescência. Um dos atenuadores colisionais mais conhecidos é o oxigênio molecular, que atenua a luminescência de praticamente todos os fluoróforos. Dependendo da amostra a ser analisada, é necessário que se remova o oxigênio dissolvido para a obtenção de medidas confiáveis de fluorescência ou de meia-vida. O mecanismo por qual o oxigênio atua como “quencher” é alvo de discussões. O mais utilizado é o que diz que o oxigênio paramagnético faz com que o fluoróforo passe por um cruzamento intersistemas e vá para o estado tripleto.

2.7 Relações quantitativas Importantes

A Lei de Beer-Lambert (equação 2) relaciona a concentração de uma espécie química (C) e a intensidade da radiação absorvida (I_a):

$$I_a \equiv I_0 - I_t \equiv I_0 \left(1 - 10^{-\epsilon bc}\right) \quad (2)$$

onde I_0 e I_t são respectivamente, as intensidades de radiação incidente e radiação transmitida, ε é a absorvidade molar característica da espécie química absorvente, b é a espessura do caminho óptico percorrido pela radiação dentro do compartimento onde se encontra a amostra. No processo luminescente, I_a passa a ser denominada de radiação de excitação.

Como ocorre a competição de vários processos pela desativação do estado excitado singlete, a intensidade de luminescência I_L (equação 3) é obtida pela multiplicação da equação 2 por ϕ_L , que é o fator que indica a fração de moléculas do estado excitado que fluorescem efetivamente.

$$I_L \equiv \Phi_L I_a \quad (3)$$

Assim, combinando se as equações 2 e 3, temos a equação 4:

$$I_L \equiv \Phi_L I_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc}) \quad (4)$$

Considerando que a amostra que contém o luminóforo esteja em solução, que a perda por espalhamento da radiação de excitação seja mínima, e que o valor de $\varepsilon \cdot b \cdot C$ seja menor que 0,02 (condições óticamente finas observadas em soluções diluídas do luminóforo), pode-se fazer a expansão em série da equação 4. Pode-se negligenciar os termos superiores da série para simplificar o procedimento, obtendo-se assim a equação 5:

$$I_L = 2,3 \phi_L I_0 \varepsilon \cdot C \cdot b \quad (5)$$

Ou

$$I_L = k C \quad (6)$$

Onde o valor de k pode ser obtido por uma curva analítica.

O efeito quantitativo da presença de agentes desativadores da fluorescência medida é dado pela relação de Stern-Volmer (equação 7):

$$\frac{I_L^0}{I_L} \equiv 1 + K_q [Q] \quad (7)$$

na qual I_L^0 e I_L são as intensidades das luminescências respectivamente na ausência e presença do agente desativador Q , K_q é a constante de Stern-Volmer, que por sua vez é a razão entre a constante de velocidade do quenching (k_q) e o somatório das outras constantes de velocidade dos processos de desativação do estado excitado singleto ou tripleto. A relação entre K_q e k_q é dada pela equação 8, onde τ_0 é o tempo de vida do evento luminescente na ausência do agente desativador.

$$K_q = k_q \tau_0 \quad (8)$$

Considerando que a taxa para colisão bimolecular em solução na temperatura ambiente é da ordem de $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e que todas as colisões resultam em desativação, o valor máximo para k_q será $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. No caso da fluorescência, que tem tempo de vida na ordem de ns (por exemplo, $\tau_0 = 1 \text{ ns}$), o valor esperado para K_q é 10 L mol^{-1} , que, ao ser substituído na equação de Stern-Volmer, implica em um quenching dinâmico da fluorescência praticamente negligenciável para concentrações de agente desativador na ordem de 1 mmol L^{-1} . Ou seja, neste caso espera-se desativação significativa apenas em casos nos quais o agente desativador é um componente majoritário na matriz onde o analito se encontra (por exemplo, uma substância ativa associada presente em maior quantidade ou em um veículo, como no caso de medicamentos), já considerando as diluições inerentes à preparação das amostras.

Para se aproveitar o potencial máximo da luminescência de um luminóforo é necessário conhecer quais e como os parâmetros experimentais afetam esse fenômeno. Em aplicações na química analítica, a manipulação dessas condições experimentais pode acarretar em significativo aumento, tanto da sensibilidade, quanto da seletividade do método.

3 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

3.1 Introdução

O termo quimiometria foi proposto no final dos anos 70 para descrever as técnicas e operações associadas ao tratamento matemático e à interpretação de dados químicos. Foi provavelmente dentro da área de química analítica que a quimiometria causou mais impacto (Sena, Trevisan e Poppi, 2005), devido à maior otimização da resposta analítica, de tempo e por fazer com que o preparo da amostra deixe de ser essencial.

A classificação e interpretação da grande quantidade de dados gerados pelo avanço da instrumentação e automação dentro dos laboratórios de análise podem ser fatores limitantes nas análises, principalmente se não houver a utilização de uma análise adequada. Além disso, a quimiometria possibilitou a criação de novas metodologias de análise. Um bom exemplo é a determinação de espécies sem a necessidade de um sinal analítico seletivo, ou seja, o sinal analítico não precisa ser proveniente apenas da espécie que se deseja determinar.

A espectroscopia molecular foi a área da química analítica que contou com a maior contribuição da quimiometria. Foram desenvolvidas nas últimas décadas numerosas metodologias quantitativas baseadas na combinação de calibração multivariada (Martens e Naes, 1989; Brereton, 2000) com técnicas, tais como absorção no ultravioleta (UV) / visível, no infravermelho, (IV) médio ou próximo, Raman e fluorescência molecular. A combinação de quimiometria e espectroscopia molecular vem encontrando aplicação em várias áreas importantes, sendo uma das principais a determinação direta de fármacos.

Em situações nas quais há dificuldade ou impedimento na determinação de um analito devido à presença de interferentes, o uso de calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto com o analito de interesse. “A idéia central consiste em substituir a separação física das espécies pela separação quimiométrica de seus sinais” (Sena, Trevisan e Poppi, 2005). As vantagens potenciais da determinação direta são:

- Maior rapidez;
- Redução do uso de reagentes;
- Baixo custo; e
- Simplificação no preparo da amostra, diminuindo as possibilidades de erro causadas pela manipulação.

Nos últimos anos, as principais aplicações desta estratégia ocorreram no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e em análises clínicas. Tornou-se possível, por exemplo, a determinação simultânea direta de vários princípios ativos em um mesmo produto farmacêutico (Sena e Poppi, 2004; Sena *et al.*, 2004) e também a de fármacos em amostras complexas, como por exemplo plasma, soro e urina, sem necessidade de separação prévia dos constituintes. (Arancibia e Escandar, 2003; Damiani *et al.*, 2004)

Os métodos de calibração usados em química analítica podem ser classificados de acordo com a dimensão dos dados analisados (Brooksh e Kowalski, 1994).

- Métodos de ordem zero: são usados para tratar dados univariados, que são gerados por instrumentos como eletrodos íon-seletivos, pHmetros e colorímetros. A resposta medida para cada amostra é um valor escalar (tensor de ordem zero) e, como estes métodos demandam total seletividade para o analito de interesse, eles não podem ser feitos na presença de interferentes;
- Métodos de primeira ordem: são usados para tratar dados multivariados, gerados por instrumentos, tais como espectrômetros e cromatógrafos. As respostas destes instrumentos fornecem um vetor (tensor de primeira ordem) de dados para cada amostra. É possível nestes casos a calibração na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes no conjunto de calibração usado para construir o modelo.

A técnica de calibração multivariada de 1ª ordem considerada nesta dissertação é o PLS (“Partial Least Squares”, ou Mínimos Quadrados Parciais);

- Métodos de segunda ordem: tratam dados gerados por instrumentos que fornecem como resposta uma matriz (tensor de segunda ordem) de dados para cada amostra. Seus exemplos são as técnicas hífenadas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Espectrofluorimetria,

análise de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica ou análise de imagens também podem fornecer dados de segunda ordem. Métodos de calibração de segunda ordem são aplicados a este tipo de dados, e permitem a obtenção de uma série de vantagens sobre os outros métodos. Uma destas vantagens é a possibilidade de obtenção de espectros (ou outros sinais, dependendo da técnica empregada) puros de cada componente do sistema, aplicando um número mínimo de restrições ao modelo. Outra vantagem importante é a chamada “vantagem de segunda ordem”, ou seja, a possibilidade de calibração, sob certas condições, na presença de interferentes desconhecidos, que não precisam estar presentes no conjunto de calibração (Brooksh e Kowalski, 1994).

Deve-se mencionar que métodos de ordem igual ou superior a três são possíveis, embora não recorrentes na literatura química. Exemplo recente de dados de terceira ordem presentes na literatura são as superfícies de fluorescência obtidas em função do tempo para cada amostra (Nikolajsen *et al.*, 2003; Olivieri *et al.*, 2004). De modo geral, são denominados dados de ordem superior, dados de ordem igual ou superior a dois.

A figura 12 ilustra os dados instrumentais de diferentes ordens.

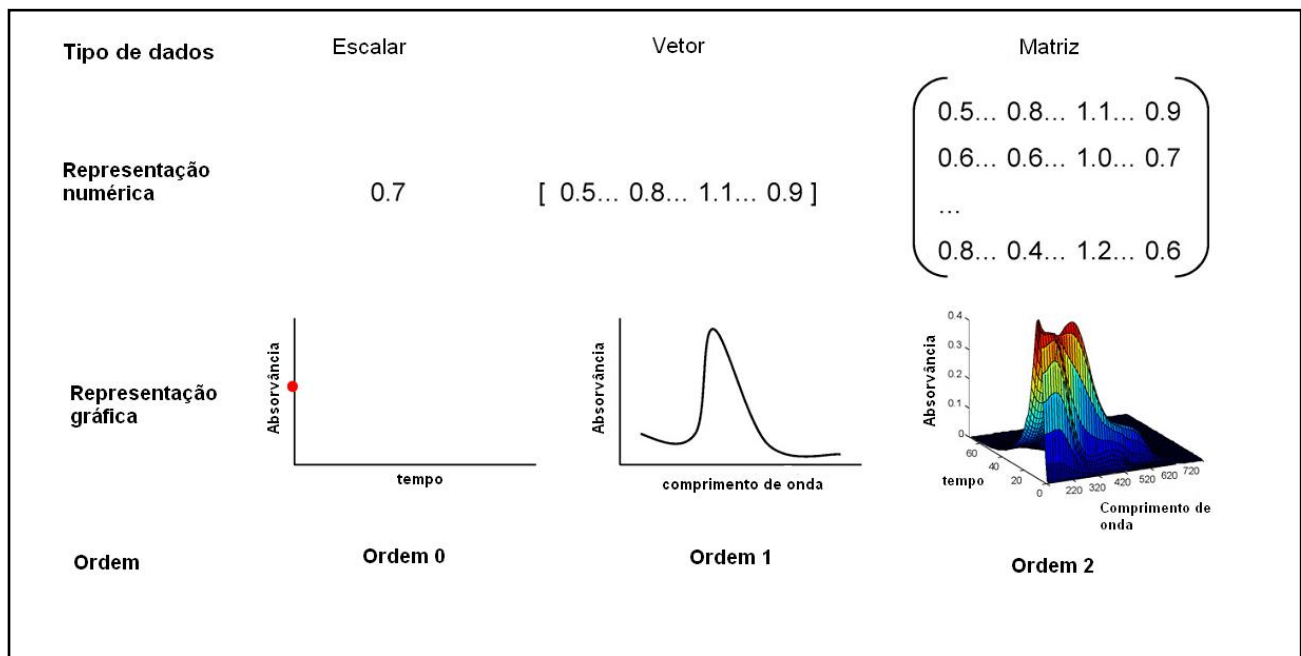


Figura 12: Diferentes ordens de dados experimentais.

Para que uma aplicação seja bem sucedida, é fundamental que a natureza dos dados e o modelo assumido pelo método quimiométrico sejam compatíveis. Os métodos de primeira ordem baseiam-se em modelos bilineares, pois os vetores de dados coletados para as várias amostras podem ser agrupados em matrizes de dados. Grande parte dos métodos de segunda ordem é baseada em modelos trilineares, pois pode-se organizar dados de segunda ordem coletados para várias amostras em um arranjo tridimensional. As matrizes de dados são colocadas lado a lado, e geram um paralelepípedo, cujas fatias são objetos ou amostras, colunas são variáveis e as linhas representam outra condição (pH, tempo, temperatura, etc). Métodos de terceira ordem demandam modelos quadrilineares e assim, sucessivamente.

3.2 Modelos de calibração de ordem zero

Neste modelo de calibração, usa-se um único valor da medida experimental por amostra (escalar), ou seja, é uma calibração univariada. Na figura 13, ele é representado por um ponto na curva, que corresponde à leitura da absorvância em um único comprimento de onda λ_1 .

Para se utilizar a calibração univariada, é necessário que a absorvância de um composto seja livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse (Valderrama, Braga e Poppi, 2009).



Figura 13: Representação de um dado escalar.

3.3 Mínimos quadrados parciais - PLS

O método dos mínimos quadrados parciais, ou PLS (de “Partial Least Squares”), é o mais utilizado em calibração multivariada e seu diferencial é que utiliza informação de y no cálculo das chamadas variáveis latentes. As matrizes X e Y são decompostas simultaneamente em uma soma de h variáveis latentes, como nas equações 9 e 10.

$$X = TP' + E = S \sum_{h=1}^h t_h p_h' + E \quad (9)$$

$$Y = UQ' + F = S \sum_{h=1}^h u_h q_h' + F \quad (10)$$

nas quais T e U são matrizes de escores das matrizes X e y , respectivamente; P e Q são as matrizes dos pesos de X e Y e E e F são os resíduos. A correlação entre os blocos X e Y é uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear, conforme a equação 11 abaixo:

$$u_h = b_h t_h \quad (11)$$

para h variáveis latentes, sendo que os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal B , que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores U de Y e a matriz de escores T de X , conforme a figura 14.

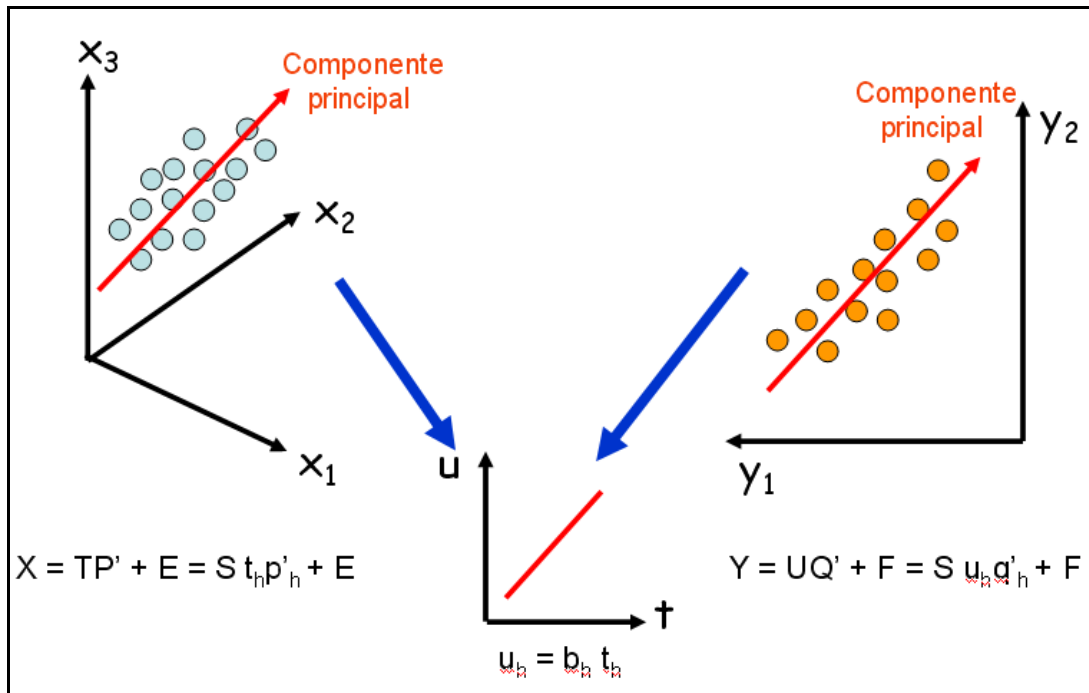


Figura 14: Representação geométrica do PLS

Pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de X e Y fazem com que se obtenha a melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos.

A matriz Y pode ser calculada de u_h , conforme a equação 12:

$$Y = TBQ' + F \quad (12)$$

e a concentração de novas amostras prevista a partir dos novos escores, T^* , substituídos na equação 12:

$$Y = T^*BQ' \quad (13)$$

A ilustração do cálculo da matriz Y é feita pela figura 15:

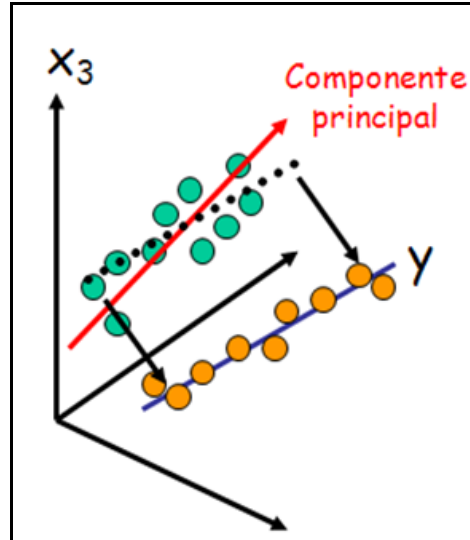


Figura 15: Algoritmo do PLS

Nesse processo, há a necessidade de achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada ("*cross validation*"), no qual o erro mínimo de previsão é determinado.

Deve-se mencionar a diferenciação entre PLS 1 e PLS 2. No primeiro método, a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz Y é um vetor coluna), já na segunda, todas as variáveis dependentes são calculadas simultaneamente.

3.4 Métodos quimiométricos de segunda ordem

Os psicometristas (pesquisadores da área de psicologia que aplicam estatística multivariada a seus dados) foram pioneiros no desenvolvimento dos métodos multidimensionais de tratamento de dados, na década de 60, com destaque para L. Tucker, que propôs os "métodos de Tucker" (Kiers, 1991).

No início dos anos 70, R. Harshman, pesquisador na área de lingüística, desenvolveu um modelo que encontrou aplicação na literatura química anos mais tarde, o PARAFAC. Na mesma época e de maneira independente, um modelo idêntico foi proposto por Carrol e Chang, ao qual deram o nome de decomposição canônica (“CANDECOMP, CANonical DECOMPosition”). A utilização de métodos multidimensionais em química foi relativamente tardia e durante toda a década de 80, a aplicação destes métodos na literatura química permaneceu relativamente restrita (Sena, Trevisan e Poppi, 2005).

Com a tese de doutorado de Bro, 1998 na década de 90, veio uma contribuição fundamental para difundir a aplicação de alguns novos métodos quimiométricos, o PARAFAC (Bro, 1997) e o N-PLS (Bro, 1996). Esta tese gerou mais de uma dezena de artigos científicos, e descreve de modo bastante claro e didático os modelos e algoritmos para uma série de métodos multidimensionais, além de apresentar exemplos de aplicações em diferentes áreas, discutindo suas generalizações. Talvez a mais importante contribuição deste trabalho foi o fato de o autor disponibilizar gratuitamente, na forma de pacotes, os algoritmos utilizados (Andersson, 2000) elaborados no ambiente Matlab (Mathworks), facilitando a difusão do uso desses métodos.

3.4.1 Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

A análise de fatores paralelos, PARAFAC (“Parallel Factor Analysis”), é um método para decomposição de dados de ordem superior. Sua base estrutural é dada pelas matrizes de pesos **A**, **B** e **C**, que contêm os elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} , respectivamente relativos às três dimensões dos dados. O modelo trilinear é ajustado para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos e_{ijk} , de acordo com a equação 14 (Sena, Trevisan e Poppi, 2005):

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (14)$$

na qual F é o número de fatores. A figura 16 mostra a representação gráfica da equação 9, indicando a decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores pesos. Cada tríade equivale a um fator do modelo PARAFAC. Alternativamente, o modelo PARAFAC também pode ser representado pela seguinte equação matricial (equação 15):

$$X = A(C \otimes B)^T + E \quad (15)$$

onde as matrizes A , B e C têm dimensões $I \times F$, $J \times F$ e $K \times F$, respectivamente, e o símbolo " \otimes " representa o produto de Khatri-Rao (Bro, 1998).

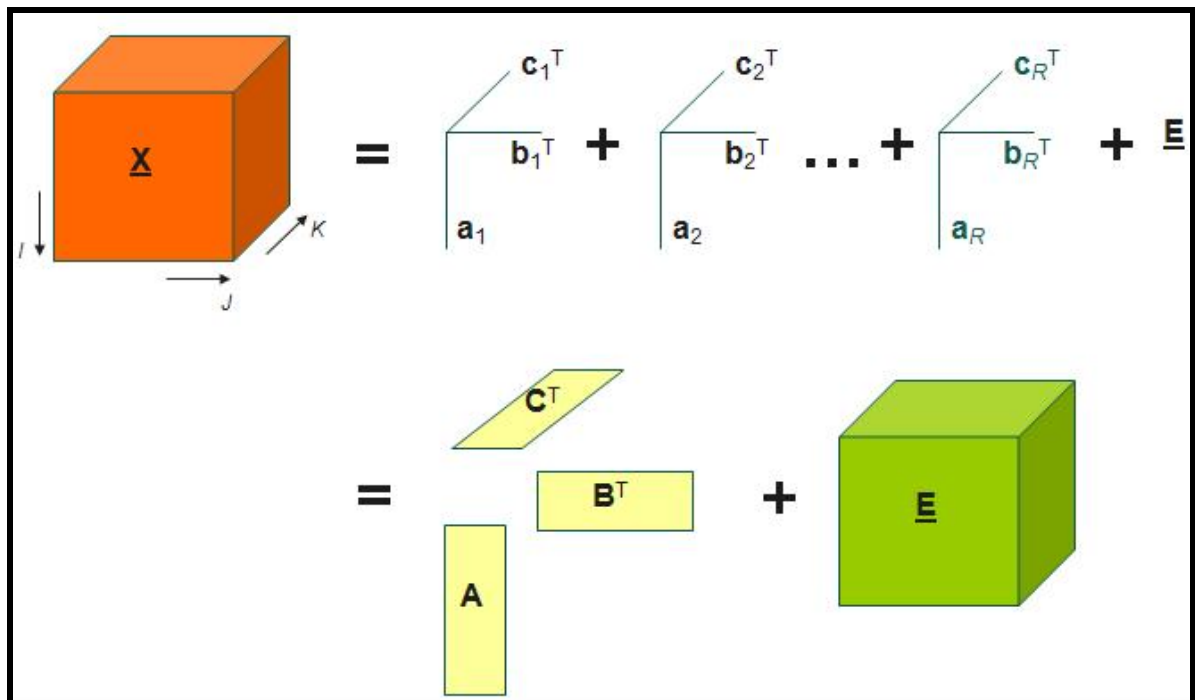


Figura 16: Representação gráfica do modelo PARAFAC.

Pode-se considerar o PARAFAC uma generalização do PCA para dados multidimensionais, ou ainda, uma versão restrita do modelo Tucker 3 (Bro, 1998; Kiers, 1991). Em comparação com o PCA e o Tucker 3, ele é menos flexível e usa

menos graus de liberdade. Como é um modelo mais restrito, o PARAFAC é adequado para a modelagem de sistemas nos quais os fatores subjacentes associam-se a leis físico-químicas claramente definidas (usa-se o termo “hard modelling” para este tipo de modelagem, em oposição ao “soft-modelling”, que ocorre quando a interpretação dos fatores não está restrita a leis físicas tão rígidas). “*Qualquer conjunto de dados que puder ser modelado adequadamente com o PARAFAC, também poderá ser modelado com o Tucker 3 ou o PCA, mas usando um maior número de graus de liberdade*” (Bro, 1997). Pode-se usar esse excesso de graus de liberdade dos outros métodos para modelar ruído ou variância sistemática de uma maneira redundante. Por isso há limitações da aplicação desses dois métodos a problemas de resolução de curvas.

Por utilizar um menor número de graus de liberdade, o PARAFAC pode ser considerado um método mais simples. Além disso, ao contrário dos outros métodos citados anteriormente, o PARAFAC fornece solução única, independente de rotações. Matematicamente, isto significa que o modelo estimado não pode sofrer rotação sem perda de ajuste. Esta última propriedade (em inglês, é denominada “uniqueness”) é de grande importância para sua utilização na modelagem de dados espectroscópicos. Graças a ela, é possível a recuperação dos espectros, ou o que quer que constitua o perfil das variáveis, dos componentes puros do sistema. Suas exigências são que os dados sejam realmente trilineares, o número correto de fatores do modelo seja escolhido e a razão sinal/ruído seja apropriada.

Uma etapa crucial da análise é escolha do número de fatores e não existe para ela um critério absoluto. A escolha pode ser feita baseada na variância explicada pelo modelo, no conhecimento químico do sistema, em métodos de reamostragem e validação cruzada ou no recentemente proposto teste de consistência trilinear (“CONCORDIA, CORE CONSistency DIAGnostic”) (Bro, 2003). O CONCORDIA se baseia na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker 3 restrito. O Tucker 3 é aplicado aos parâmetros do modelo PARAFAC estimado e, se houver consistência trilinear, espera-se que os elementos da superdiagonal do tensor central (\underline{G}) tenham valores próximos de 1 e os demais elementos valores próximos de zero, como mostra a figura 17.

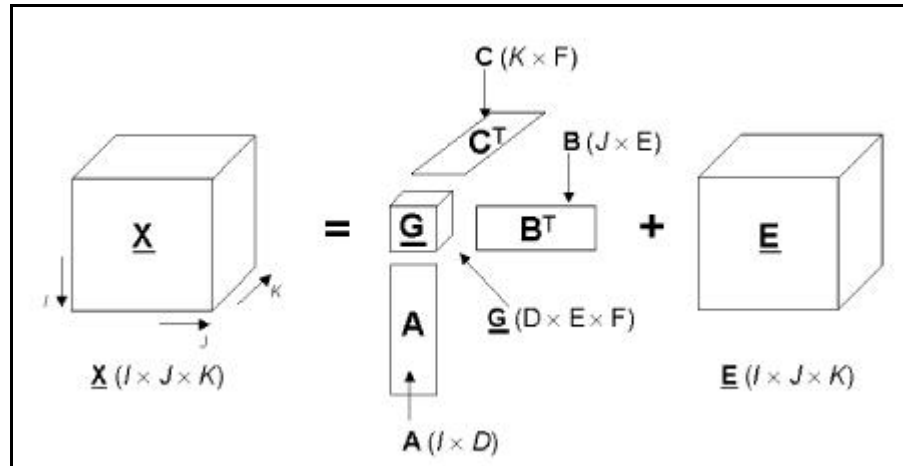


Figura 17: Representação gráfica do modelo Tucker 3 (Sena, Trevisan e Poppi, 2005).

A definição matemática do CONCORDIA é expressa pela equação 16:

$$\text{CONCORDIA} = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - h_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F h_{def}^2} \right) \quad (16)$$

nela, g_{def} é o elemento da matriz central calculada com o Tucker 3 a partir dos pesos do PARAFAC, h_{def} é o elemento de um tensor binário contendo valores um na superdiagonal e zero nas demais posições e F é o número de fatores do modelo. Um valor de CONCORDIA superior a 90% indica a adequação do modelo PARAFAC, um valor em torno de 50% indica deficiência de trilinearidade e valores próximos de zero ou negativos indicam inconsistência trilinear. A figura 18 mostra um exemplo de modelo com valor de CONCORDIA de 100% e provável adequação do modelo PARAFAC com dois fatores.

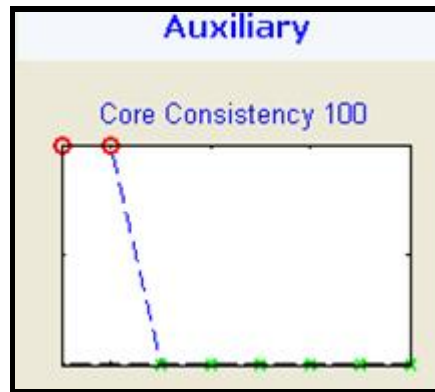


Figura 18: Utilização do CONCORDIA no PARAFAC.

O CONCORDIA é uma ferramenta para detectar sobre-ajuste em um modelo PARAFAC, mas não sub-ajuste (Sena, Trevisan e Poppi, 2005). O valor de CONCORDIA para um modelo estimado com um número de componentes menor que o real estará próximo a 100%, porque a estrutura de tal modelo será trilinear. Então, o modelo adequado será aquele com maior número de componentes e que ainda preserve a estrutura trilinear.

Os principais objetivos das aplicações de PARAFAC em química são a resolução de curvas e a calibração multivariada. O uso do PARAFAC para calibração segue uma estratégia semelhante à regressão em componentes principais. Ocorre a decomposição simultânea das amostras de concentração conhecidas e desconhecidas. Os pesos, também chamados de escores, são especificamente obtidos para o componente de interesse na amostra desconhecida e, por fim, são relacionados com as concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear (Sena, Trevisan e Poppi, 2005).

4 MÉTODO DA ADIÇÃO DE PADRÃO

Os métodos de adição de padrão são particularmente úteis na análise de amostras complexas, nas quais a probabilidade de efeitos de matriz é alta. O método de adição de padrões pode ser feito de diversas formas, uma delas, conhecida como “spiking”, envolve a adição de um ou mais incrementos de uma solução padrão a alíquotas da amostra de mesmo volume. Deve ser observado que, quando a quantidade de amostra é limitada, pode-se fazer as adições por sucessivas introduções de incrementos do padrão a um único volume medido da amostra.

As medidas são realizadas com a amostra original e depois com a amostra mais o padrão, após cada adição. A matriz da amostra permanece quase inalterada após cada adição na maioria das versões do método de adição de padrão, a única diferença é a concentração do analito ou, em casos que envolvem a adição de um excesso de reagente analítico, a concentração do reagente. Todos os outros constituintes da mistura reacional devem ser idênticos porque os padrões são preparados em alíquotas da amostra (Skoog, Holler e Nieman, 2002).

Uma extensão do método de adição de padrão para dados multivariados é chamada método de adição de padrão de segunda ordem (“Second order standard addition method” – SOSAM). Este método pode ser resumido em três etapas:

1 – Utiliza-se decomposição direta trilinear para decompor uma matriz de terceira ordem, formada pela junção de dados de segunda ordem da amostra e de cada adição sucessiva. O número correto de fatores usados na decomposição deve corresponder ao número de analitos mais os interferentes;

2 – A matriz correspondente à decomposição da amostra que foi construída, deve conter em suas colunas a informação relativa às concentrações do analito e do interferente. Para identificar qual coluna corresponde ao analito de interesse, os loadings do método espectral (ou outro tipo de sinal) devem ser comparados com o espectro do analito puro;

3 – Os valores de cada coluna identificada, correspondentes às concentrações dos analitos nas amostras e após cada adição, são usados em uma regressão linear, semelhantemente a uma adição de padrão pelo método univariado.

Um aspecto essencial do SOSAM é o uso da vantagem de segunda ordem, definida como a habilidade de realizar uma determinação na presença de interferentes desconhecidos. O uso da vantagem de segunda ordem necessita que os dados sejam trilineares e que o método utilizado seja de segunda ordem e decomponha o conjunto de dados de modo que eles sejam preditos juntamente com o conjunto de calibração.

5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE LEVOFLOXACINO

A quantificação de levofloxacinó é fundamental em matrizes biológicas e em medicamentos que o contêm em sua formulação, já que se trata de um importante antibiótico da 3ª geração de fluorquinolonas.

Existem muitos métodos analíticos usados na determinação de levofloxacinó. Entre eles, podem ser citados:

5.1 HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência)

Foram citadas metodologias com diversos detectores. Santoro *et al.*, 2006 utilizou detector UV, suas matrizes foram comprimidos e soluções injetáveis e o comprimento de onda utilizado foi de 279 à 295 nm. Os autores obtiveram linearidade em concentrações que iam de 4,0 a 24,0 µg/mL, o erro padrão relativo foi inferior a 1,0% e a média de recuperação da substância foi de 99,54%.

Wong, Juzwin e Flor, 1996 utilizaram plasma e urina humanos, também com detector UV. Foi feita separação líquido-líquido do analito com diclorometano antes das injeções e a absorvância foi medida em 330nm. O método se mostrou linear em concentrações de 0,08 a 5,18 µg/mL de levofloxacinó em plasma e de 23 a 1464 µg/mL em urina, com tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos.

González, Mochón e de la Rosa, 2005 determinaram o analito em urina juntamente com cefamina, outro antibiótico utilizado em conjunto com quinolonas para combater patógenos mais resistentes. O comprimento de onda utilizado para o levofloxacinó foi 292 nm e seu limite de detecção foi de 2,2 µg/mL.

Outro detector usado com o HPLC é o de fluorescência, muito utilizado em determinação de fluorquinolonas juntas em plasma humano (Liang, Kays e Sowinski, 2002; Siewert, 2006), com $\lambda_{\text{excitação}} = 296 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 504 \text{ nm}$ e linearidade obtida de 0,1 a 6 µg/mL. A detecção por espectrometria de massa foi utilizada também para plasma (Ji e Jeong *et al.*, 2006), a curva analítica ficou linear na faixa de 10,0 a 5000

ng/mL, o limite de quantificação de levofloxacina foi de 10,0 ng/mL usando 20 μ l de plasma e sua taxa de recuperação foi de 55,2%.

5.2 Quimioluminescência

Aparece associada a um lantanídeo, neste caso o európio, como amplificador de luminescência em amostras de comprimidos (Ocaña e Barragán *et al.*, 2004). O levofloxacino foi determinado na faixa de 0,5 a 3,5 μ g/mL, com limite de detecção de 0,100 μ g/mL e erro padrão relativo entre 1,0 e 2.5%.

O mesmo método também foi associado à análise por injeção de fluxo utilizando luminol, peróxido de hidrogênio e nanopartículas de ouro em matrizes de urina (Wang *et al.*, 2007). Os autores descobriram que a reação de quimioluminescência do sistema constituído por luminol e peróxido de hidrogênio, era catalisada por nanopartículas de ouro e que a intensidade desta reação aumentava fortemente na presença de fluorquinolonas. A faixa de concentração linear obtida para levofloxacino foi de 0,01 a 1,44 μ g/mL, seu limite de detecção foi de 8,0 ng/mL com erro padrão relativo de 2,1%.

5.3 Espectrofluorimetria

A espectrofluorimetria tem sido muito usada na quantificação da levofloxacino. As matrizes utilizadas por Du, Yang, Wang, 2004 foram medicamentos em forma de comprimidos, urina e plasma associados à formação de complexo de transferência de carga com 7,7,8,8- tetracianoquinodimetano (TCNQ). Foi descoberto que o TCNQ reage com algumas fluorquinolonas e produz complexos estáveis, cujas fluorescências ficaram de 15 a 90 vezes maiores que os antibióticos estudados em separado. Em condições otimizadas, a curva analítica se mostrou linear em concentrações de 0,02 a 2,2 μ g/mL, com limites de detecção de 0,006 a 0,016 μ g/mL.

González, Mochón e de la Rosa, 2000 utilizaram micelas para o incremento do sinal analítico em comprimidos, urina e soro humanos. A adição de dodecil sulfato de

sódio (SDS) aumentou a fluorescência do medicamento, aumentou a sensibilidade e permitiu que o levofloxacino fosse medido diretamente no soro e na urina diluída, nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 420 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também foi utilizado o método de adição de padrão e as taxas de recuperação foram de 105%, com erro padrão relativo de 1,9% para o soro e de 102% com erro relativo padrão de 2% para a urina.

5.4 Eletroforese Capilar

Liu *et al.*, 2008 desenvolveram um método de determinação de levofloxacino em urina, utilizando separação por eletroforese capilar e detecção por eletroquimioluminescência. Para a separação foi utilizado um capilar de sílica fundida, com 55 cm de comprimento, 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. Foram utilizadas urinas de dois homens saudáveis. Em condições otimizadas, a separação ocorreu em 9 minutos. O limites de detecção para a solução padrão foi 0,23 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação na urina humana foi 0,50 $\mu\text{g/mL}$. O percentual de recuperação de levofloxacino na urina humana foi de 92,3%.

5.5 Outros métodos:

Outros métodos encontrados foram a voltametria cíclica e de onda quadrada com eletrodo de carbono em amostras de urina (Radi e El-Sherif, 2002) e a análise por injeção de fluxo, usando detector UV, potenciometria e condutometria em comprimidos (Ahtiokka, Atkosar e Can, 2002).

6 VALIDAÇÃO DE MODELOS

6.1 Estudo da linearidade do método

Linearidade é o intervalo no qual os sinais instrumentais e a concentração de um analito apresentam uma relação proporcional ou linear entre si. Deste modo, é possível relacionar o valor de uma variável dependente, que neste caso é o sinal medido, através do valor de uma variável independente, a concentração. Embora possa acontecer de se utilizar respostas de ordem superior (quadrática, cúbica...) para estabelecer a relação entre sinal analítico e concentração, a resposta linear é mais prática e exata e por isso a mais usada (Finete, 2005).

Determina-se a linearidade de uma resposta analítica pela construção de uma curva analítica, que consiste na resposta de um instrumento a várias concentrações de um determinado analito. O número de pontos da curva depende da extensão da faixa de concentração de interesse. Em geral, cinco ou seis pontos são usados sendo que, dependendo das circunstâncias, pode-se considerar adequada uma curva com quatro pontos.

No caso de relações lineares, o resultado da análise de regressão é representado graficamente e a curva resultante possui característica bem definida pela equação da reta, cuja correlação pode ser expressa pelo coeficiente de correlação (r) ou do coeficiente de determinação (r^2).

Valores de correlação iguais a 0,90 são considerados metrologicamente adequados, embora algumas agências de credenciamento de competência de ensaios requeiram valores de pelo menos 0,99 para validação de metodologias analíticas (Ribani, Bottoli e Melo, 2004).

6.2 Precisão

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão (coeficiente de correlação) ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

O desvio padrão (s) é a medida mais utilizada para se estimar a precisão e a variabilidade do método, ele se define pela equação 17.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (17)$$

em que \bar{x} é a média aritmética dos resultados e n é o número de amostras.

6.3 Exatidão

Indica o quanto o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência concordam. Comumente em aplicações com Calibração Multivariada a exatidão é calculada como a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP – "Root Mean Squares Error of Prediction"): (Braga e Poppi, 2004)

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (18)$$

no qual y é o valor estimado, \hat{y} é o valor predito e n é o número de amostras de validação.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para a realização deste trabalho são de grau analítico, não havendo necessidade de purificação prévia. Para a preparação das soluções aquosas, utilizou-se água (resistividade igual a $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) destilada e purificada em um sistema de troca iônica e osmose reversa (Ultrapurificador, modelo Master System 1000, Gehaka, Brasil). Na dissolução dos fármacos também foi utilizado Etanol P.A. (Vetec Química Fina Ltda. Rio de Janeiro, Brasil).

O fármaco utilizado na preparação dos padrões foi Levofloxacino (Sigma, USA).

O medicamento contendo levofloxacino utilizado para a aplicação da metodologia foi adquirido em drogarias locais, de nome LEVOFLOXACINO, vendido na forma de comprimidos (EMS, Brasil).

As matrizes biológicas utilizadas para a aplicação da metodologia de quantificação de levofloxacino com fluorescência e HPLC foram obtidas de uma doadora, do sexo feminino, que estava em tratamento com o antibiótico e também fazia uso de medicamentos para pressão.

As matrizes biológicas utilizadas para aplicação da metodologia de determinação dos fármacos foram amostras de urina (sem levofloxacino), obtidas de um doador saudável, do sexo masculino, que não estava tomando outros medicamentos, e enriquecidas com quantidades conhecidas do antibiótico.

7.2 Instrumentação

7.2.1 Espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro utilizado nos estudos preliminares foi o da Perkin Elmer, modelo LS – 45. A partir dele, foram obtidos os espectros de excitação e emissão e as intensidades dos sinais fluorescentes dos analitos estudados.

A fonte de excitação do aparelho era uma lâmpada pulsátil, tipo descarga de xenônio, que produz pulsos de 8 μ s de duração, e 20 kW de potência. O esquema óptico é formado por um conjunto de dois monocromadores, que cobrem as faixas espectrais de 200 – 800 nm para excitação e 200 – 900 nm de emissão. O detector é um tubo fotomultiplicador sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm.

O espectrômetro de fluorescência utilizado para a realização dos estudos conclusivos, foi o Lumex, modelo Fluorat-02-PANORAMA, Rússia. O aparelho é composto por uma lâmpada de xenônio como fonte de excitação, dois monocromadores, um para a excitação e outro para emissão, ambos cobrindo uma faixa de 210 – 840 nm, com banda espectral de 8 nm e um tubo fotomultiplicador como detector dos sinais de luminescência.

Para as medidas de fluorescência das amostras e dos padrões, utilizou-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

7.2.2 HPLC

A determinação de levofloxacino no medicamento e na urina foi feita por um cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência (Waters, EUA). O detector de fluorescência possui redes de difração para a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão, e lâmpada de fonte contínua. As condições instrumentais selecionadas foram com a detecção fluorimétrica ajustada em 292/490 nm. Os parâmetros foram otimizados para determinação de levofloxacina, em tempo total de corrida de 11 minutos (com tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos), sendo a coluna utilizada uma C18 X-Terra RP 18,5 μ m de comprimento e fase estacionária com partículas de 4,6 x 150 μ m. A atenuação do detector de fluorescência foi de 100.000 (EUFS), o ganho ajustado em 1 e o fator de sensibilidade de 1000,00.

A alça de amostragem utilizada foi de 20 μ L e o volume de injeção de no mínimo 100 μ L (5x o volume da alça). A vazão da fase móvel foi de 1 mL min^{-1} utilizando o modo isocrático, onde a mistura de dois solventes foi utilizada, tampão fosfato 0,02 mol L^{-1} em pH 3 e acetonitrila (88:12 v/v) . A temperatura do forno da coluna foi ajustada em 35°C. O método de Bedor, 2007 foi tomado como referência.

7.2.3 Equipamentos Auxiliares

7.2.3.1 Balança Analítica

No preparo das soluções foi utilizada a balança analítica elétrica com precisão de 0,1 mg, Bioprecisa modelo FA2104 N, Itália

7.2.3.2 Banho ultrassônico

Quando necessário, utilizou-se o aparelho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner, modelo Branson 200, Taiwan) para total dissolução dos fármacos.

7.2.3.3 Micropipetas

Foram utilizadas micropipetas reguláveis de 10 a 1000 uL da Brand (Brasil).

7.3 **Procedimentos**

7.3.1 Lavagem do material

Toda a vidraria e utensílios laboratoriais foram imersos em solução de Extran neutro (Merck, Darmsdat, Alemanha) por, no mínimo, 24 horas, seguido da imersão em solução de HNO₃ 10% v/v por igual período. Em seguida, todo o material foi lavado com água destilada e ultrapurificada, em abundância, seguido de secagem em estufa elétrica (Icamo, modelo 4 São Paulo, Brasil) a 60⁰C.

7.3.2 Preparação dos padrões

Considerando a falta de estabilidade da solução de levofloxacino, que degrada em 24 horas devido à exposição à luz e ao calor, (Córdoba- Borrego *et al.*, 1999), esta era preparada no mesmo dia da realização dos experimentos e seu recipiente era protegido da luz por papel alumínio.

7.3.2.1 Solução estoque de levofloxacino 1 µg/mL

Pesou-se 10,0 mg do sólido, dissolveu-se em água e etanol P.A. e avolumou-se para 100 mL em balão volumétrico (etanol 50% v/v). A solução foi colocada em banho de ultrassom por 3 minutos. Transferiu-se 1 mL desta primeira solução para outro balão volumétrico de 100 mL, e avolumou-se com água.

7.3.2.2 Formulações farmacêuticas e urina

Os comprimidos foram macerados (5 unidades de cada medicamento), pesou-se uma massa equivalente à massa pesada no preparo dos padrões e esta foi solubilizada em 50 mL de água ultrapura e 50 mL de etanol P.A., e colocada no ultrassom por 3 minutos.

A amostra de urina foi preparada adicionando uma concentração específica de levofloxacino (em amostras diferentes), seguida da diluição adequada para a faixa de trabalho estabelecida.

7.4 Procedimento para medição no espectrofluorímetro

A medida do sinal fluorescente das soluções foi feita em uma cubeta de quartzo, previamente limpa e rinsada com a amostra a ser medida.

Para o método univariado, as leituras foram feitas com comprimento de onda de excitação igual a 290 nm comprimento de onda de emissão de 489 nm. Para a calibração de primeira ordem, utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 290 nm, de emissão de 380 : 1 : 550 nm.. Para a calibração de segunda ordem, utilizaram-se os comprimentos de onda de excitação de 240 : 2 : 370 nm, de emissão de 380 : 1 : 550 nm. Posteriormente, para eliminar o espalhamento de radiação, os comprimentos de onda foram restringidos em comprimento de onda de excitação de 274 :2 : 308 nm e emissão de 479 :1 : 539 nm.

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES:

8.1 Estudos preliminares

8.1.1 Determinação de levofloxacino em medicamento

8.1.1.1 Método por fluorescência

Foram preparadas soluções padrão de levofloxacino no intervalo de 28,8 ng/mL – 108 ng/mL. Obtiveram-se os espectros de excitação e emissão da solução de 90 ng/mL, como mostra a figura 19, com o objetivo de selecionar os máximos dos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

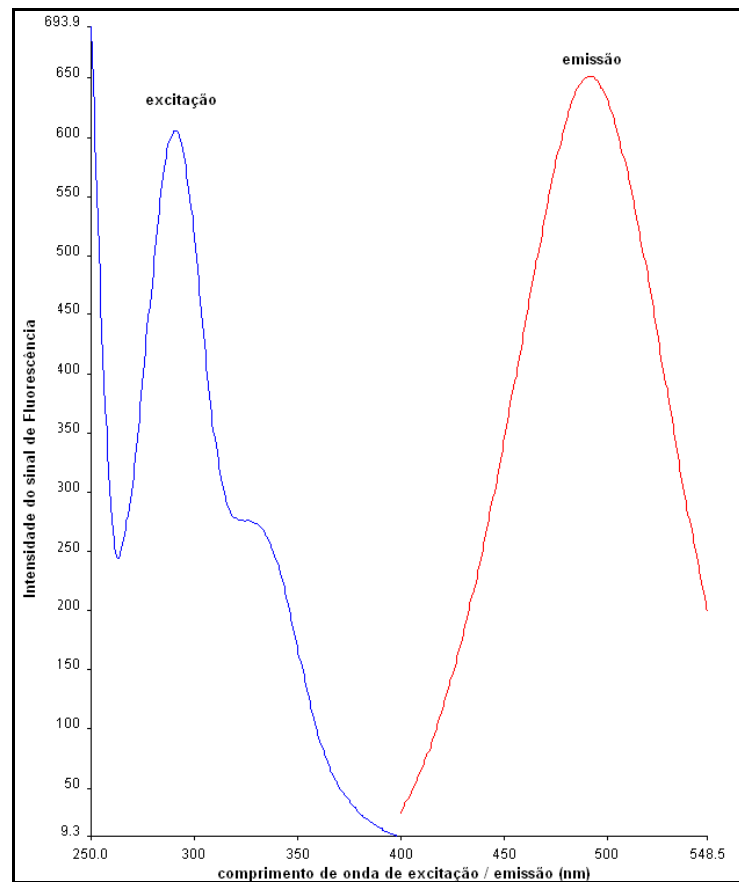


Figura 19: Espectros de excitação e emissão do levofloxacino 90 ng/mL.

Para montar a curva analítica, amostras de diluições 28,8 ng/mL, 72,0 ng/mL, 90,0 ng/mL e 108,0 ng/mL foram colocadas no espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação de 294 nm e comprimento de onda de emissão de 494 nm. A figura 20 mostra os espectros de emissão obtidos.

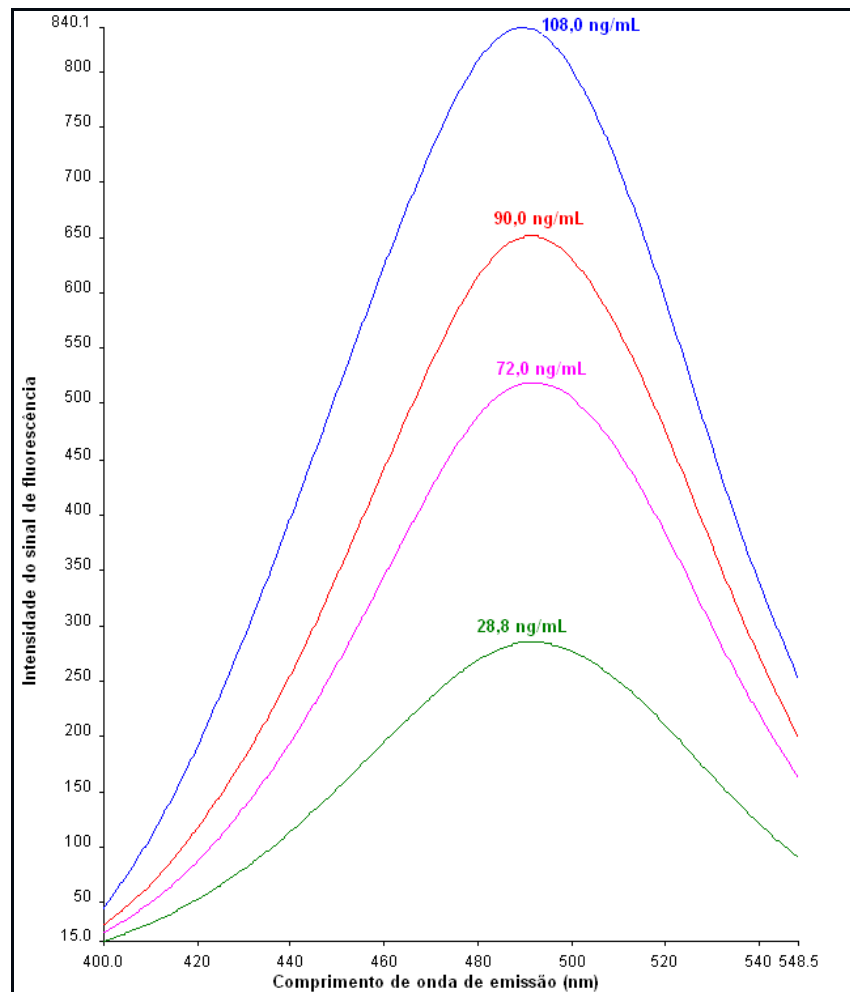


Figura 20: Espectros de emissão das soluções de calibração de levofloxacino.

8.1.1.1.1 Estudo da linearidade do método

Após medir os sinais de fluorescência, montou-se a curva analítica, que segue a seguinte equação: $y = 9,413x + 8,583$, que tem coeficiente de correlação (r) igual a 0,999 e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,998. A figura 21 mostra a curva analítica de levofloxacino no espectrofluorímetro, onde y é a intensidade de fluorescência e x a concentração do analito.

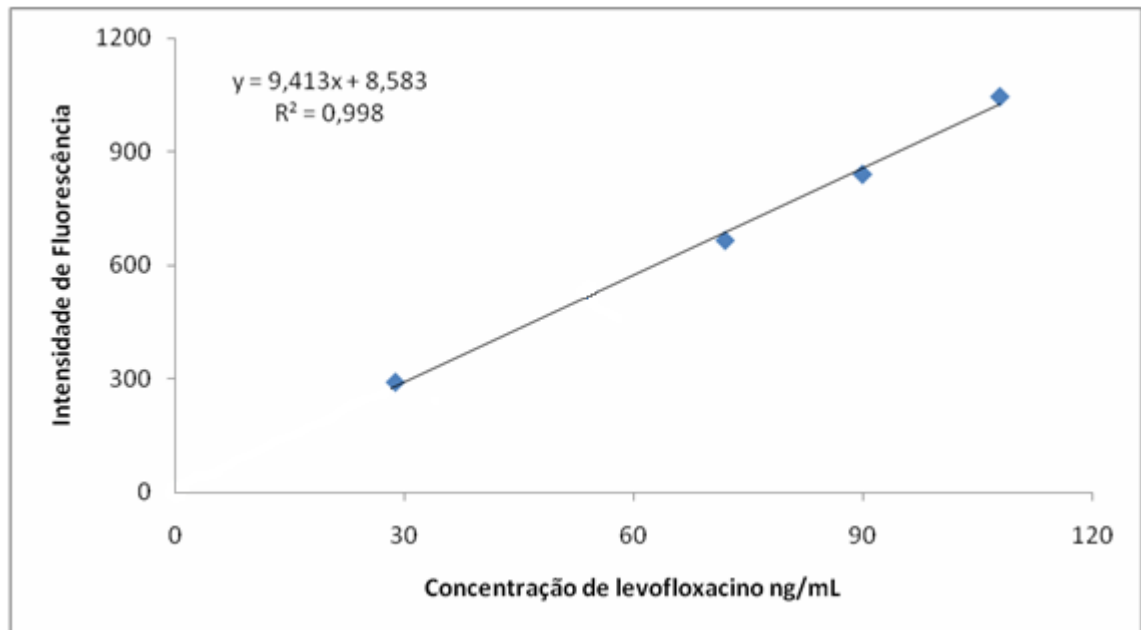


Figura 21: Curva analítica de levofloxacino no espectrofluorímetro

8.1.1.1.2 Determinações com o medicamento contendo levofloxacino

Prepararam-se soluções de medicamento com as seguintes concentrações de referência: 2,9 ng/mL, 3,2 ng/mL, 5,4 ng/mL, 7,2 ng/mL, 9,0 ng/mL e 10,8 ng/mL. As concentrações obtidas estão na tabela 1:

Tabela 1: Concentrações de referência e estimadas de levofloxacino

Concentração de referência (ng/mL)	Concentração estimada (ng/mL)	Erro Absoluto	Erro Relativo, %
2,9	1,8	-1,1	-37,9
3,2	4,1	0,9	28,1
5,4	5,5	0,1	1,9
7,2	6,0	-1,2	-16,7
9,0	7,6	-1,4	-15,6
10,8	10,8	0,0	0,0
Média dos erros \pm desvio padrão		- 0,5 \pm 0,9	- 6,7 \pm 22,3

O gráfico da figura 22 mostra a relação entre concentração estimada e concentração medida.

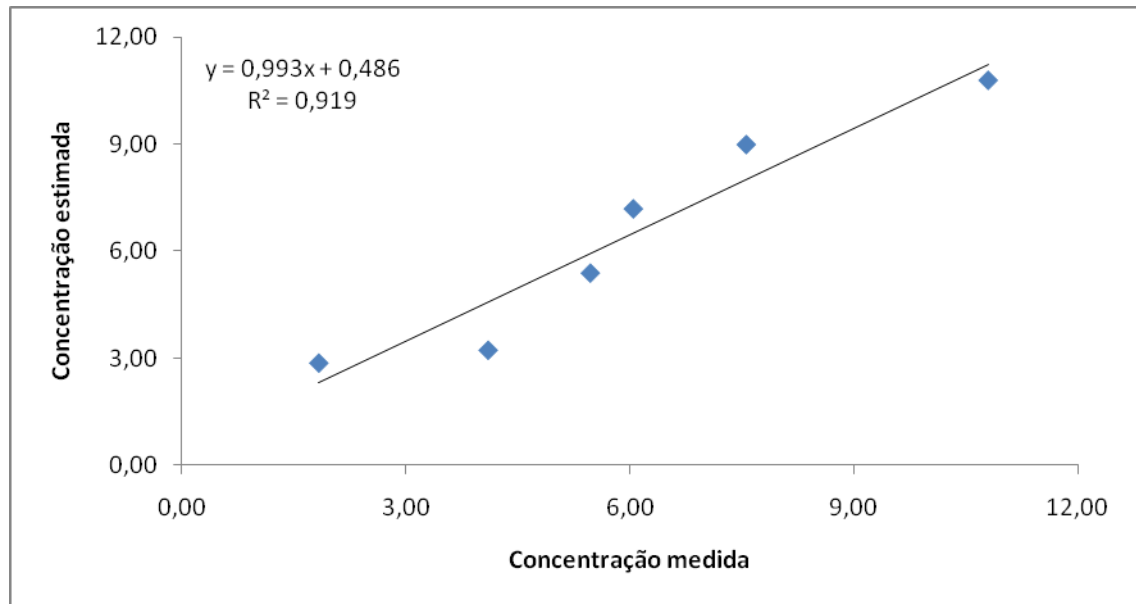


Figura 22: Gráfico de comparação de concentrações de referência e estimadas.

Os valores dos erros absolutos e relativos, assim como os elevados valores dos desvios padrão, indicam que a exatidão dos resultados não está satisfatória. Isto se

deve à pequena faixa de concentração utilizada nos experimentos, fato que foi melhorado nos estudos conclusivos.

8.1.1.2 Método por HPLC

Após todos os parâmetros otimizados, programou-se os testes, iniciando pela preparação dos solventes da fase estacionária, que eram água ultrapurificada, tampão fosfato de pH 3,0 e concentração 20 mmol/L (Merck, Brasil) e acetonitrila grau UV/HPLC (Merck, Brasil). Os solventes foram previamente filtrados em membrana de 0,45 µm e degaseificados em banho de ultra-som por, no mínimo, 20 minutos. Nessas condições acima relatadas, o tempo de retenção de levofloxacina foi de 10 minutos.

Para determinar os parâmetros de medição (tempo de retenção e intensidade do sinal), foi injetada uma solução de levofloxacino 9,0 µg/mL. A figura 23 mostra o sinal do levofloxacino no HPLC, com tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos.

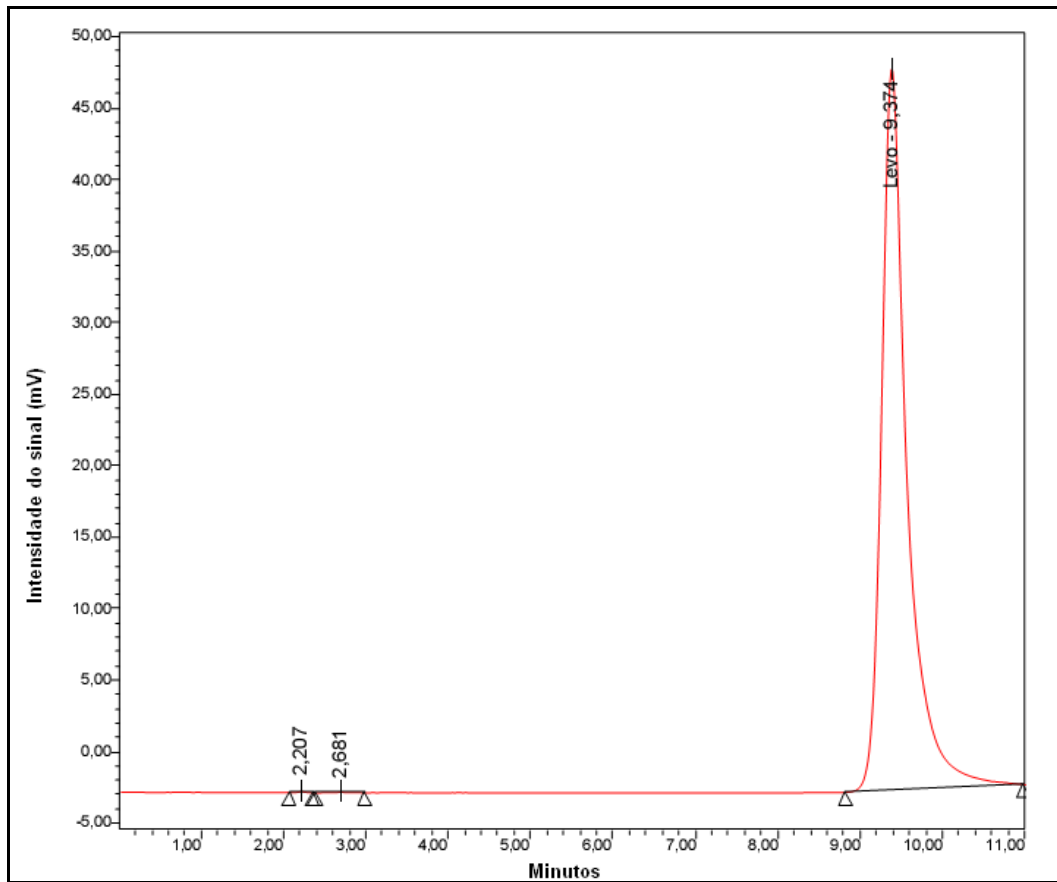


Figura 23: Cromatograma obtido para a análise de levofloxacino no HPLC.

Após isso, mediu-se o sinal das soluções com as concentrações: 2,9 $\mu\text{g/mL}$, 3,2 $\mu\text{g/mL}$, 5,4 $\mu\text{g/mL}$, 7,2 $\mu\text{g/mL}$ e 9,0 $\mu\text{g/mL}$

A figura 24 mostra os sinais obtidos para cada concentração:

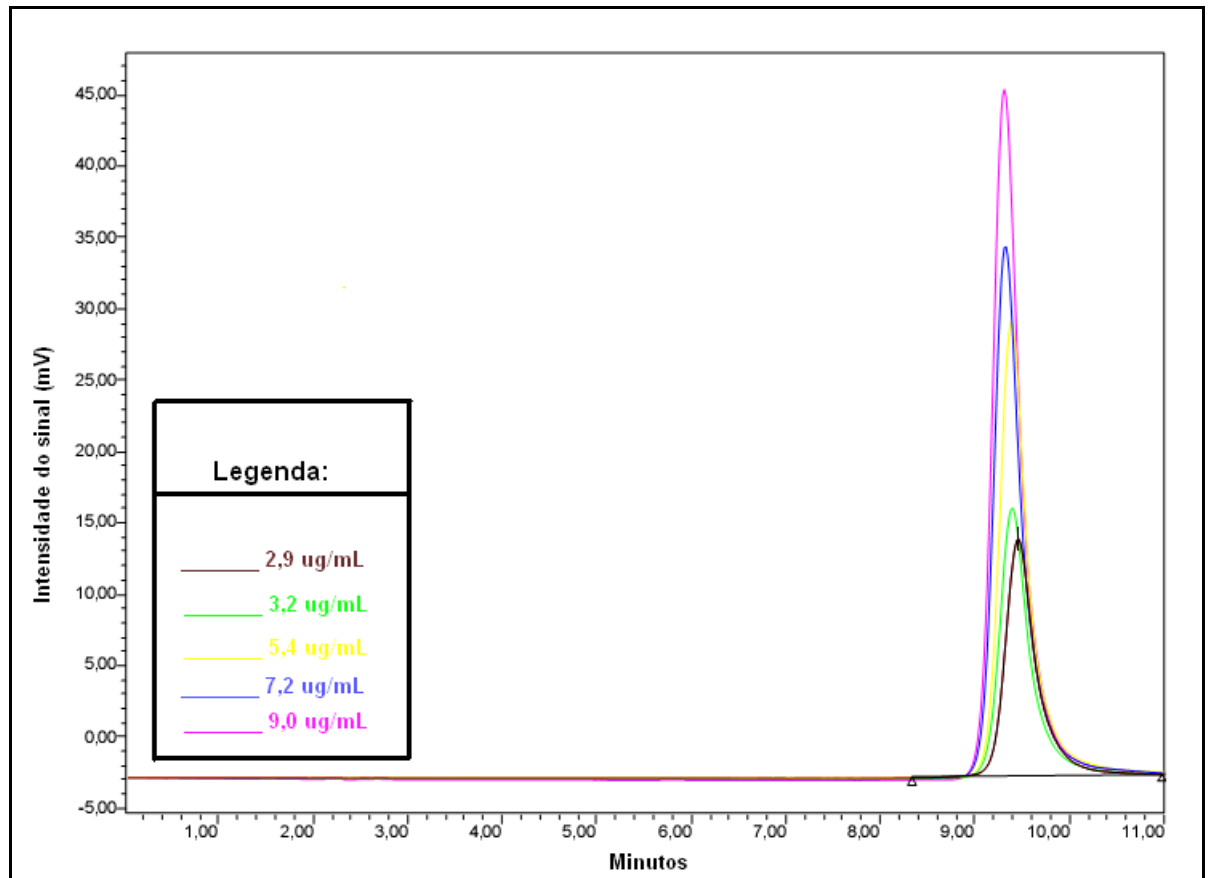


Figura 24: Sinais obtidos no HPLC para cada concentração de levofloxacino.

8.1.1.2.1 Linearidade

Montou-se a curva analítica, que tem a equação $y = 10693 x + 95327$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,996 e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,991.

A figura 25 mostra a curva analítica de levofloxacino no HPLC.

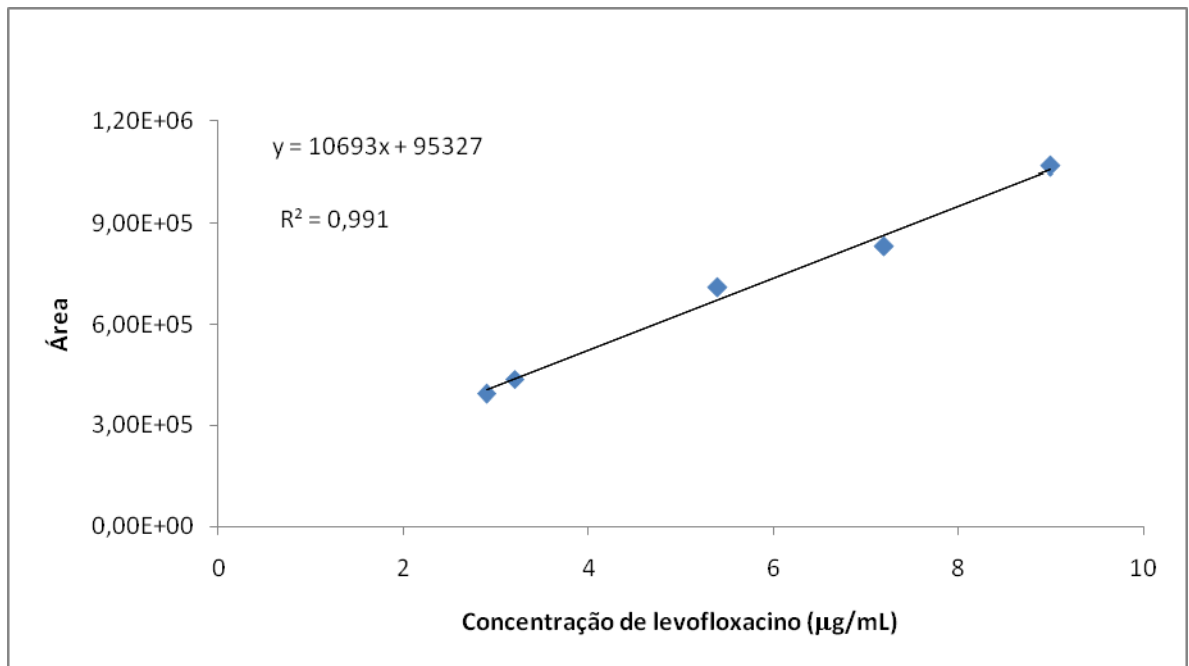


Figura 25: Curva analítica de levofloxacino no HPLC

8.1.1.2.2 Determinações com o medicamento contendo levofloxacino

Para posterior comparação entre os métodos analíticos, preparou-se soluções com os medicamentos de maneira que suas concentrações fossem: $2,9 \mu\text{g/mL}$, $3,2 \mu\text{g/mL}$, $5,4 \mu\text{g/mL}$, $7,2 \mu\text{g/mL}$, $9,0 \mu\text{g/mL}$ e $10,8 \mu\text{g/mL}$.

As concentrações obtidas foram:

Tabela 2: Tabela comparativa de concentrações de referência x estimadas

Concentração de referência ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração estimada no HPLC-Fluo ($\mu\text{g/mL}$)	Erro Absoluto	Erro Relativo, %
2,9	2,2	-0,7	-24,1
3,2	3,3	0,1	3,1
5,4	5,5	0,1	1,9
7,2	6,1	-1,1	-15,3
9,0	7,4	-1,6	-17,8
10,8	10,8	0,0	0,0
Média dos erros \pm desvio padrão		- 0,5 \pm 0,7	- 8,7 \pm 11,8

O gráfico da figura 26 mostra a relação entre concentração estimada e concentração medida.

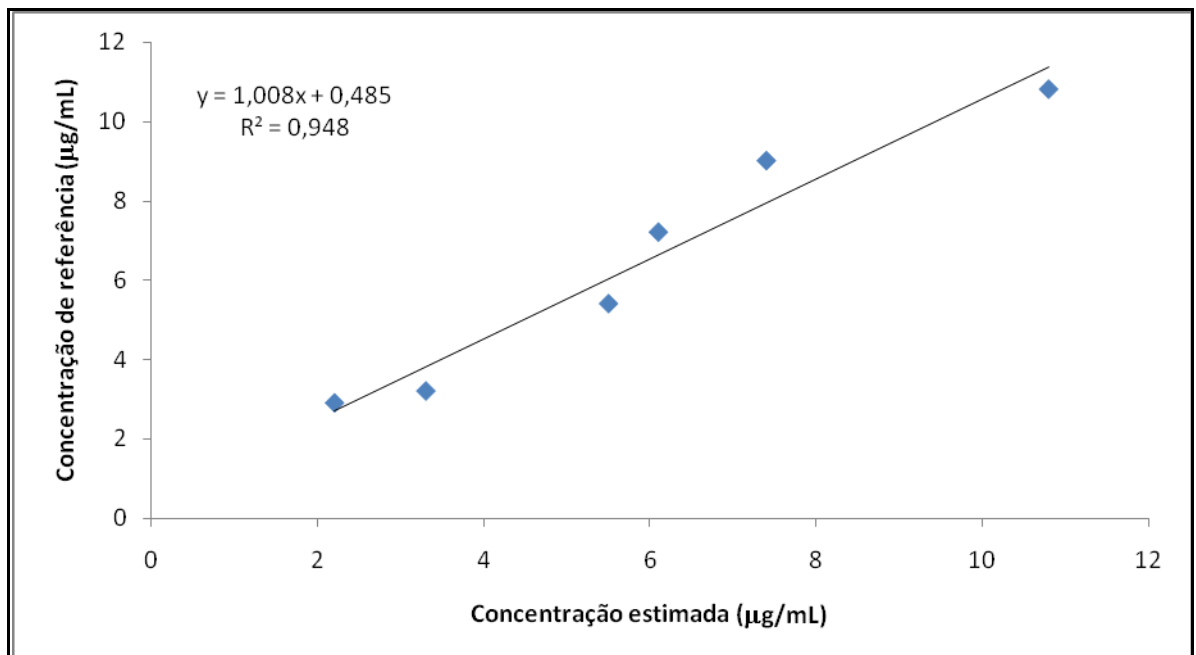


Figura 26: Gráfico de comparação de concentrações estimadas e medidas.

Como no caso do espectrofluorímetro, os valores dos erros absolutos e relativos e os elevados valores dos desvios padrão, indicaram que a exatidão dos resultados não está satisfatória. Isto também se deve à pequena faixa de concentração utilizada nos experimentos, que também foi melhorada nos estudos conclusivos.

8.1.1.3 Comparação dos métodos

8.1.1.3.1 Levofloxacino padrão

Repetitividade é o valor máximo esperado para a diferença entre dois ou mais resultados obtidos com a mesma amostra e o mesmo método, sob as mesmas condições, tais como: mesmo operador, mesmo equipamento, mesma data, mesma temperatura, para as repetições. Foi feito o teste de repetitividade para a primeira comparação.

Foram feitas cinco medições com a mesma concentração de levofloxacino (9,0 µg/mL) no espectrofluorímetro e no HPLC. Deve-se ressaltar que todas as comparações de dados foram feitas respeitando as diluições.

A tabela 3 mostra as intensidades de sinais obtidos, o desvio padrão e mostra o teste F como referência estatística para fazer a comparação entre os métodos:

Tabela 3: Dados comparativos para padrão de levofloxacino.

N° de replicatas	Valor medido (ng/mL)	
	Fluorescência	HPLC-Fluorescência
1	9,0	9,0
2	9,0	9,0
3	9,0	9,3
4	8,9	8,7
5	9,0	9,6
Média ± Desvio padrão	9,0 ± 0,04	9,1 ± 0,34
n° de replicatas(n)	5	5
F_0	0,01	
$F_{\text{crítico}}$	2,306	

Com o objetivo de comparar os métodos, fez-se um teste - F:

$$F_{\text{calculado}} \equiv \frac{(0,04)^2}{(0,34)^2} \quad (19)$$

De acordo com a hipótese nula, valores superiores ao F crítico de 2,306 indicariam falta de concordância dos resultados dos métodos. Isto não ocorreu, já que o valor de F foi 0,01, que é inferior ao da hipótese nula e indica que os métodos são concordantes.

8.1.1.3.2 Levofloxacino no Medicamento

Foram medidas diferentes concentrações de medicamento levofloxacino no espectrofluorímetro e no HPLC para que se pudesse comparar os sinais obtidos seriam os mesmos para concentrações equivalentes.

A tabela 4 abaixo mostra os valores obtidos:

Tabela 4: Valores de concentração de levofloxacinó no fluorímetro e no HPLC.

N° da replicata	Valor medido ($\mu\text{g/mL}$)	
	Fluorescência	HPLC-Fluorescência
1	1,8	2,2
2	4,1	3,3
3	5,5	5,5
4	6,0	6,1
5	7,6	7,4
6	10,8	10,8

Com os dados acima, montou-se uma curva analítica para melhor comparação e obtenção dos coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2). A figura 27 mostra o gráfico que ilustra essa comparação.

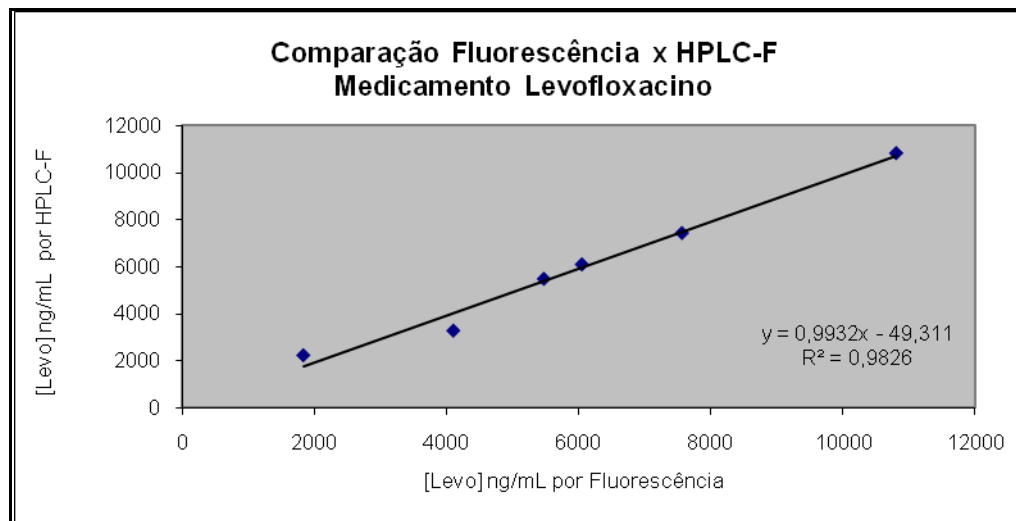


Figura 27: Comparação entre Fluorescência e HPLC na determinação de levofloxacinó.

A equação da reta obtida foi: $y = 0,9932x - 49,311$. O coeficiente de correlação (r) foi de 0,991 e o de determinação (r^2) foi 0,983. Por este resultado, observa-se que as duas técnicas obtêm respostas equivalentes para um mesmo nível de concentração.

8.1.2 Urina de paciente

A urina utilizada nestes experimentos era de uma paciente que estava no terceiro dia de medicação, tomando cápsulas de levofloxacino de 500 mg.

8.1.2.1 Quantificação por fluorescência molecular

Foram feitas seis medições com urina diluída 10000 vezes. Seus resultados foram interpolados na curva analítica e são iguais a 43,56 ng/mL, levando em conta o fator de diluição, a concentração estimada de levofloxacino na urina de paciente doente foi igual a 435,6 $\mu\text{g/mL}$. Este valor se mostrou bem superior ao esperado, que seria cerca de 250 $\mu\text{g/mL}$ de levofloxacino, isto foi atribuído ao fato de a urina amplificar o sinal de fluorescência do medicamento.

8.1.2.2 Quantificação por HPLC

Inicialmente, foram feitos testes para avaliar qual a melhor diluição da urina em água purificada para a detecção do levofloxacino. A primeira diluição testada foi de 500 vezes. A figura 28 mostra o cromatograma obtido.

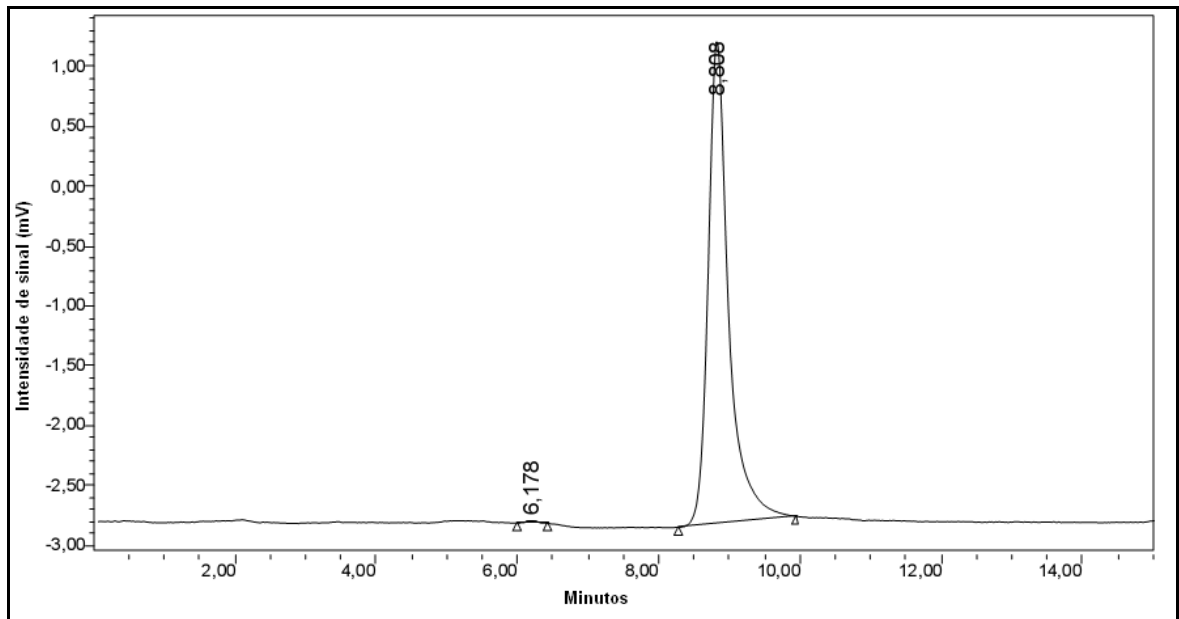


Figura 28: Sinal obtido para o levofloxacino com urina diluída 500 x.

Como a intensidade do sinal foi muito baixa, optou-se pela diluição de 50 vezes. O cromatograma da figura 29 mostra a amplificação do sinal com a diluição escolhida.

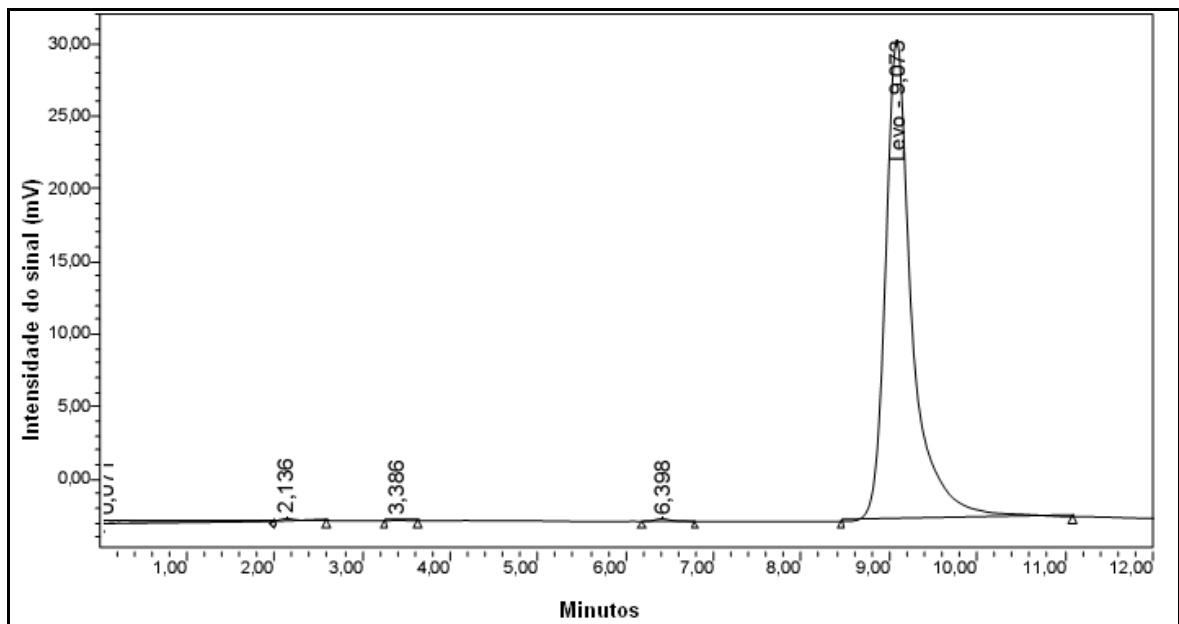


Figura 29: Cromatograma obtido para o levofloxacino com urina diluída 50 x.

Foram feitas duas medições e seus resultados foram interpolados na equação da curva analítica para o levofloxacino no HPLC: $y = 107,1 x + 93999$. Os resultados obtidos foram: 5,7 e 5,8 $\mu\text{g/mL}$, levando em conta o fator de diluição, a concentração estimada de levofloxacino na urina de paciente doente foi igual a 286,2 e 288 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados foram mais próximos ao esperado que os obtidos por fluorescência.

8.1.2.3 Comparação dos Métodos

Observou-se que não houve equivalência dos resultados obtidos por fluorescência molecular e HPLC. O segundo método obteve resultados bem próximos aos esperados, enquanto o primeiro obteve resultados muito discrepantes desta realidade. Isto se deve ao fato de a urina amplificar o sinal de fluorescência do levofloxacino, o que confirma mais uma vez a necessidade da utilização de outro método concomitante à fluorescência molecular para que se tenha melhores resultados.

8.2 Estudos conclusivos

8.2.1 Método Univariado

Foram preparadas soluções padrão aquosas de levofloxacino nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng/mL , com uma replicata em 100 e outra em 200 ng/mL .

Como foi dito anteriormente, as medidas dos sinais de fluorescência para o método univariado foram feitas em comprimentos de onda de excitação de 290 nm e emissão de 489 nm. Neste gráfico, ao contrário do gráfico da figura 20, não foi feito o alisamento das curvas.

A figura 30 mostra os espectros obtidos nas 6 concentrações.

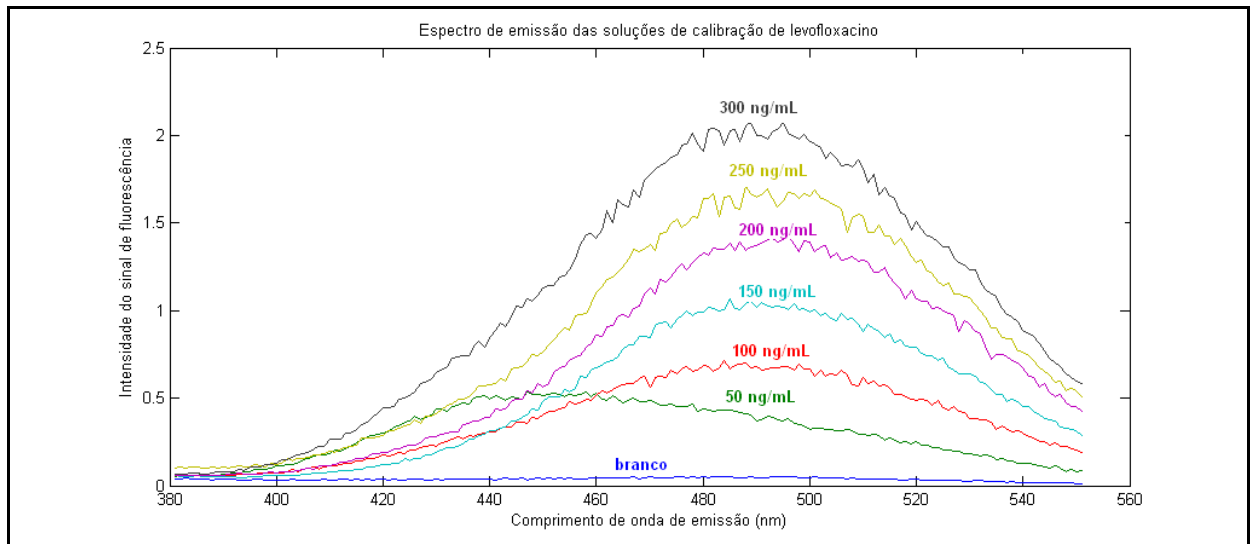


Figura 30: Espectros de emissão de levofloxacino

Nota-se na figura 30, que o espectro da solução de concentração 50 ng/mL está deslocado em relação aos demais. Isso provavelmente pode ser atribuído a uma degradação da solução padrão.

O cálculo das concentrações do conjunto de calibração seguiu a seguinte equação:

$$y = 153,68 x - 6,5555 \quad (23)$$

Segue abaixo, na figura 31, o gráfico da curva analítica:

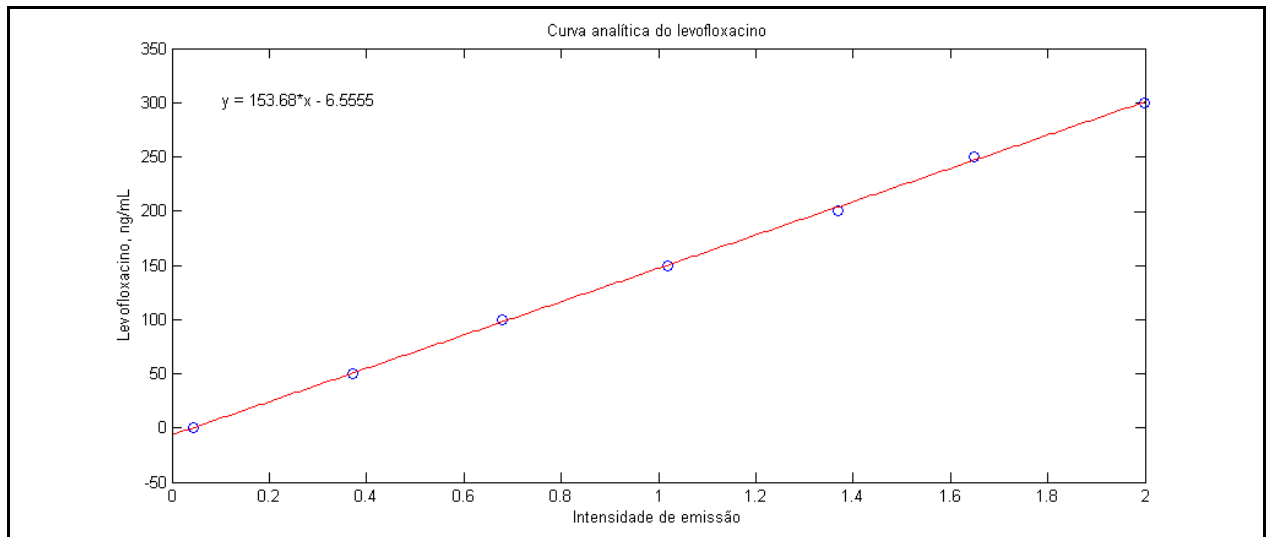


Figura 31: Curva analítica do levofloxacino pelo método univariado com regressão inversa.

A equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtido, de 0,9996, indicam que há linearidade no método e que é possível fazer a determinação de levofloxacino utilizando fluorescência molecular.

8.2.1.1 Método univariado utilizando medicamentos

As soluções foram preparadas pesando-se a massa de 5 comprimidos de levofloxacino. A massa foi devidamente macerada, homogeneizada e pesou-se o equivalente a 10 mg de levofloxacino, para que se fizessem as diluições e se obtivesse a solução com 100 ng/mL.

Estudo de recuperação

As soluções preparadas com adição de padrão estão na tabela 5:

Tabela 5: Soluções preparadas com adição de padrão:

Solução A	Solução somente com medicamento	5 réplicas
Solução B	Solução com medicamento + 50 ng/mL de padrão de levofloxacino	3 réplicas
Solução C	Solução com medicamento + 100 ng/mL de padrão de levofloxacino	3 réplicas
Solução D	Solução com medicamento + 150 ng/mL de padrão de levofloxacino	3 réplicas

A tabela 6 abaixo mostra as concentrações obtidas para cada solução:

Tabela 6: Concentrações de levofloxacino obtidas no medicamento aplicando calibração de ordem zero.

	Solução A: Medicamento (100 ng/mL)	Solução B: Medicamento + 50 ng/mL	Solução C: Medicamento + 100 ng/mL	Solução D: Medicamento + 150 ng/mL
	91,6	141,7	204,1	238,4
	91,5	152,5	181,9	263,4
	92,7		192,7	
	107,2			
Média	95,7	147,1	192,9	250,9
% Recuperação		98,1	96,4	100,4
Média da recuperação ± desvio padrão	(98,3 ± 2,0) %			

Foram removidas algumas réplicas que apresentavam resultados muito discrepantes (uma réplica da solução A, uma da solução B e uma da solução D). Após isso, a média de recuperação obtida foi de 98,3%, com desvio padrão de 2,0%.

A massa de 5 comprimidos foi medida e seu valor foi dividido por 5, para que se obtivesse a massa correspondente a cada comprimido. Fazendo os cálculos correspondentes às diluições e tomando como parâmetro as concentrações estimadas pelo modelo e suposta quantidade do analito presente em cada comprimido, estima-se que o comprimido tem, na verdade, 93,7% da concentração de 500 mg anunciada no rótulo.

8.2.2 PLS

Os comprimentos de onda utilizados foram comprimento de onda de excitação de 290 nm e emissão de 479 :1 : 539 nm.

As soluções foram preparadas da mesma maneira que o método anterior. As concentrações obtidas para o estudo de recuperação foram:

Tabela 7: Concentrações de levofloxacino obtidas no medicamento aplicando PLS.

	Medicamento (100 ng/mL)	Medicamento + 50 ng/mL	Medicamento + 100 ng/mL	Medicamento + 150 ng/mL
	86,8	134,4	198,9	257,6
	91,1	128,5	175,8	265,9
	86,5		185,9	
	100,0			
Média	91,1	131,5	186,9	261,8
% Recuperação		93,2	97,8	108,6
Média da recuperação ± desvio padrão	(99,9 ± 7,9) %			

A discrepância maior dos dados, evidenciada desvio padrão de 7,9 % indica que este método, que utiliza calibração de primeira ordem, em nada melhorou os resultados do método anterior, que é de ordem zero e apresenta desvio padrão de 2,0%.

8.2.3 Determinação de levofloxacino em urina

8.2.3.1 Urina enriquecida com levofloxacino (“spiking”)

Na figura 32, tem-se o espectro tridimensional correspondente à matriz de emissão-excitação de fluorescência para calibração ajustada em amplos espectros de emissão e excitação. Ele mostra a presença de espalhamento Raman, assim como o segundo harmônico da grade de difração.

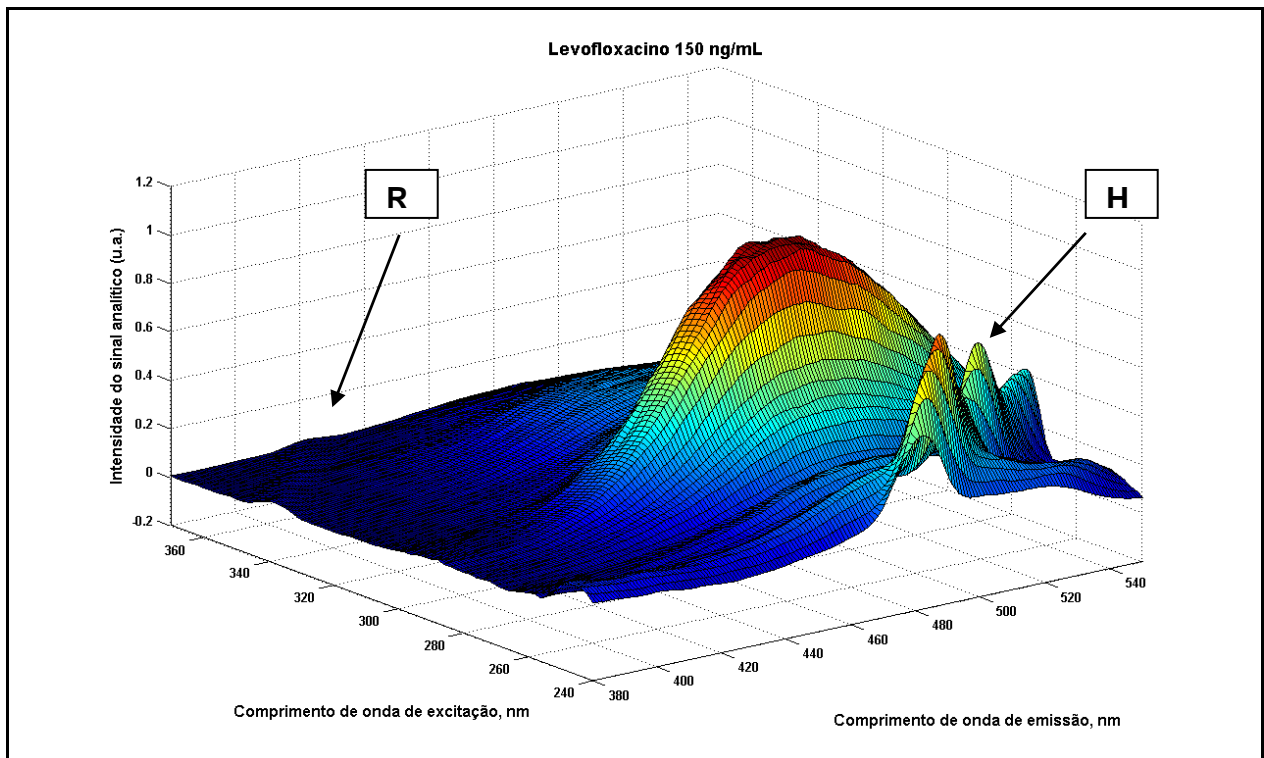


Figura 32: Espectro tridimensional da matriz emissão-excitação de fluorescência de solução padrão de levofloxacino 150 ng ml⁻¹, indicando a presença de uma grade de difração harmônica (H) e espalhamento Raman (R), respectivamente indicados.

Obtém-se uma melhor compreensão considerando-se a superfície de contorno, que corresponde à figura 33, com os respectivos espalhamentos evidenciados:

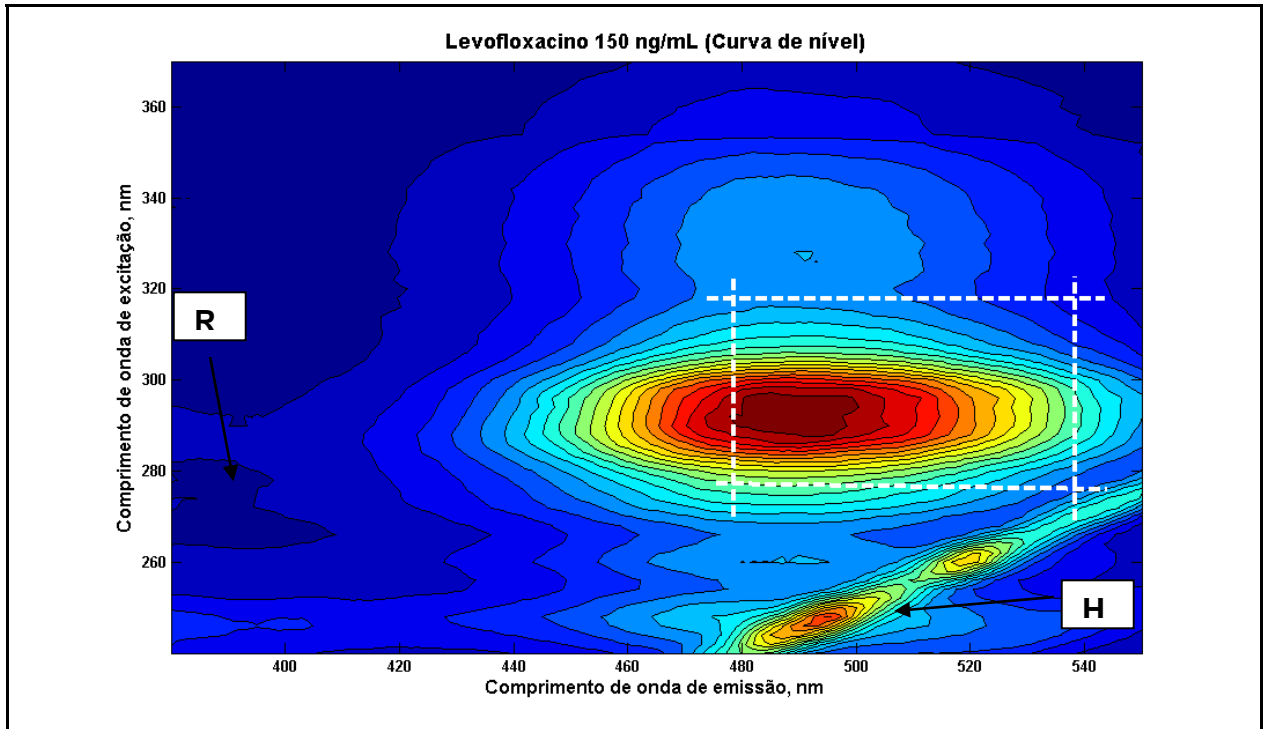


Figura 33 – Superfície de contorno para a matriz anterior. O retângulo indica as faixas de emissão e excitação selecionadas para a calibração com o PARAFAC.

Com o intuito de evitar a presença de sinais que não possuem correlação com as concentrações de interesse, as matrizes de emissão-excitação foram utilizadas somente nas faixas sensíveis de emissão e excitação, onde somente o analito contribui de fato com a intensidade do sinal fluorescente. Ou seja, o intervalo de emissão utilizado foi de 479 a 539 nm, em intervalos de 1 nm ($J = 61$ espectros) e o de excitação foi de 278 a 318 nm, com intervalos de 2 nm ($K = 21$ espectros), construindo um total de 1281 espectros, como mostra a superfície de contorno da figura 34.

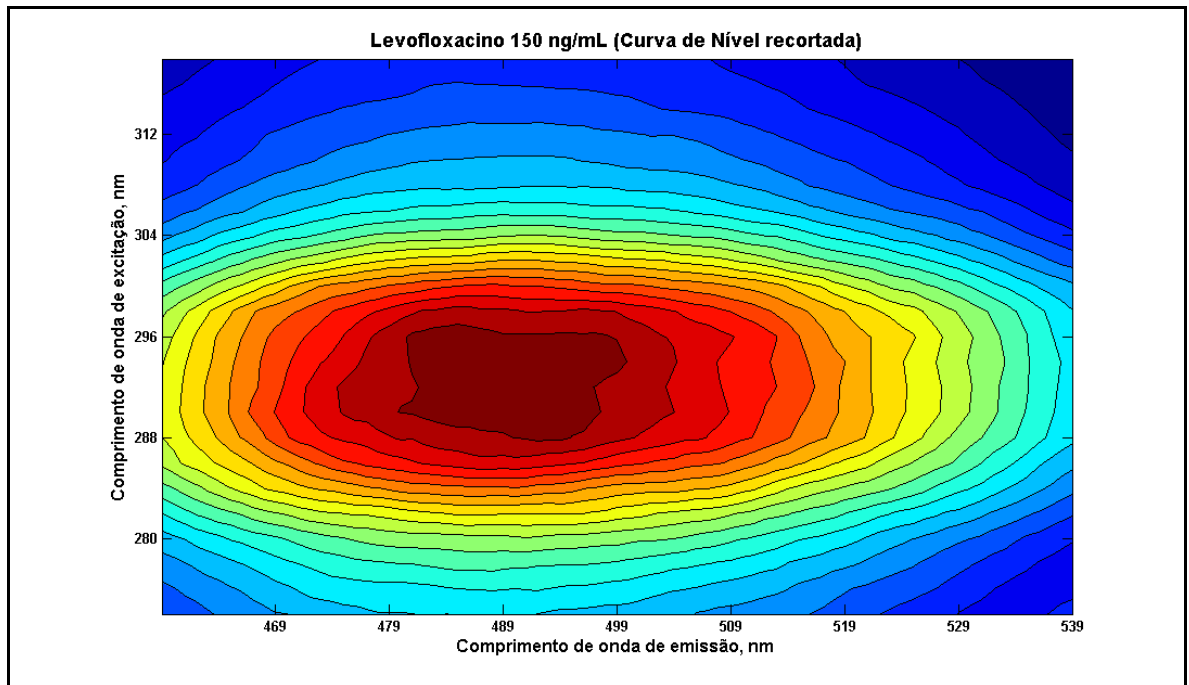


Figura 34: Nova superfície de contorno sem os espalhamentos

Após a remoção do espalhamento da radiação no espectro luminescente, a amostra de urina foi diluída em três níveis: 100 vezes, 500 vezes e 1000 vezes. Posteriormente, as soluções diluídas, em triplicata, foram enriquecidas com 50, 100, e 150 ng/mL de levofloxacin para emprego do método de adição de padrão.

A figura 35 mostra o novo espectro tridimensional de levofloxacin 150 ng/mL:

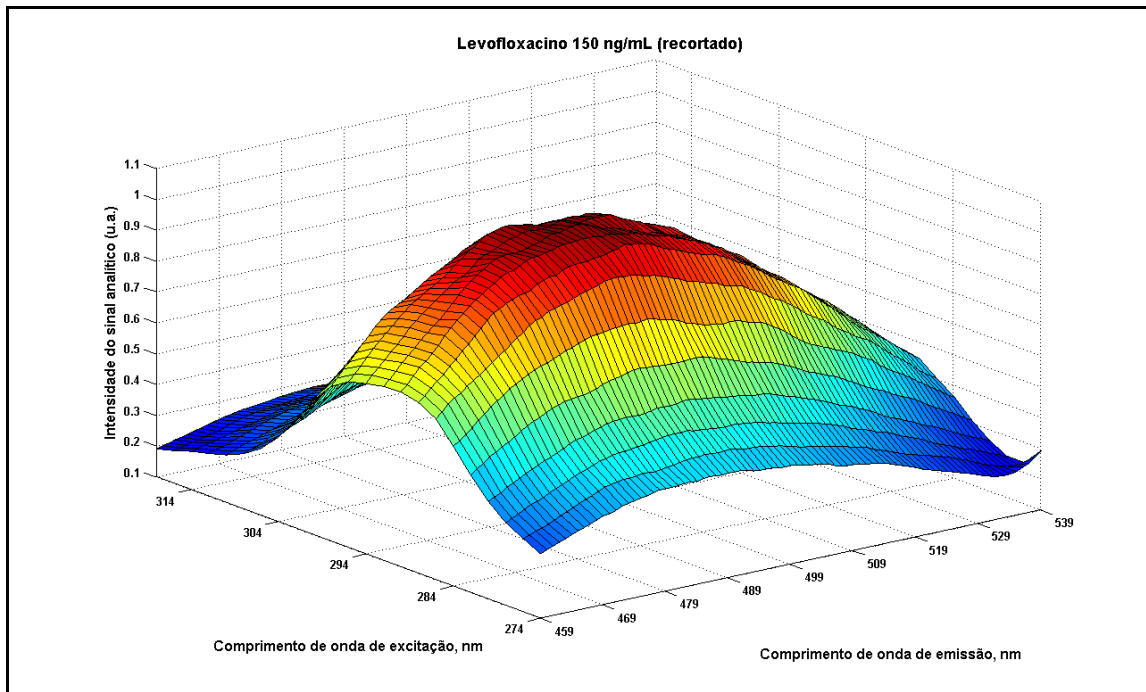


Figura 35: Novo espectro tridimensional de solução padrão de levofloxacino 150 ng ml⁻¹

Observou-se que a intensidade do sinal de fluorescência da urina diluída 100 vezes era bem alta e superior à do sinal do levofloxacino com concentração de 150 ng/mL, como mostra a figura 36, obtida de um espectro tridimensional ainda sem os comprimentos de onda selecionados anteriormente.

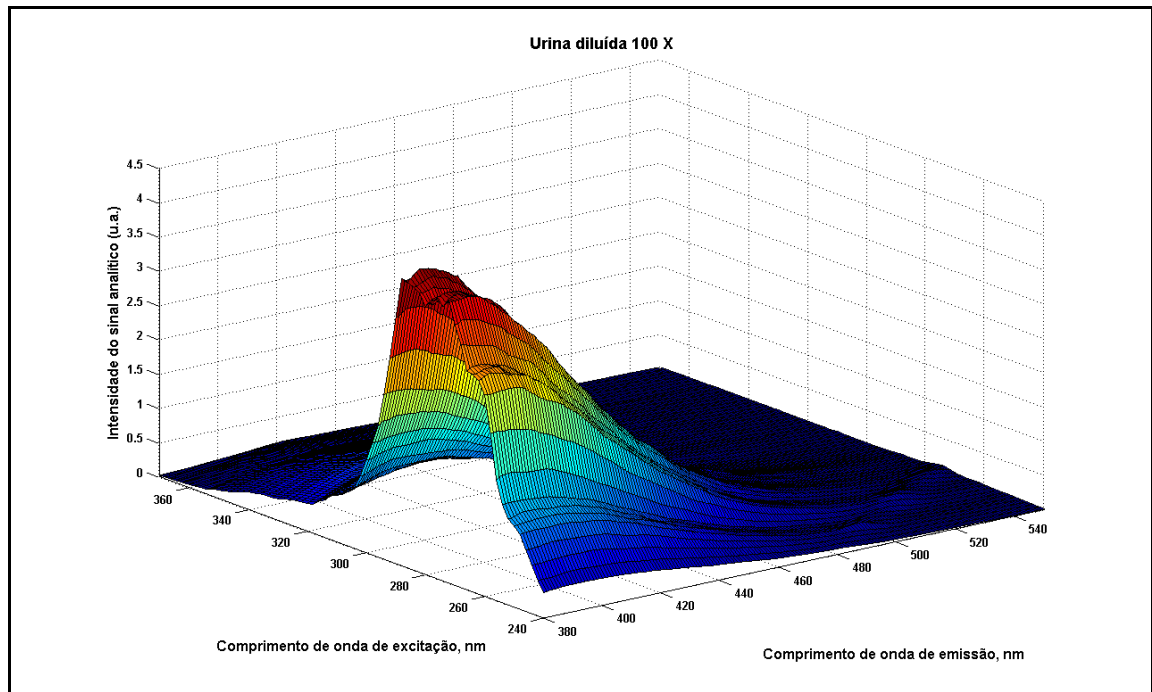


Figura 36: Espectro tridimensional de urina diluída 100 vezes.

Com a finalidade de avaliar a influência da diluição nas intensidades de sinal do espectro de fluorescência da urina, as figuras 37 e 38 mostram os espectros da urina diluída 100 e 1000 vezes, respectivamente e já recortadas nos mesmos comprimentos de onda selecionados para o levofloxacino:

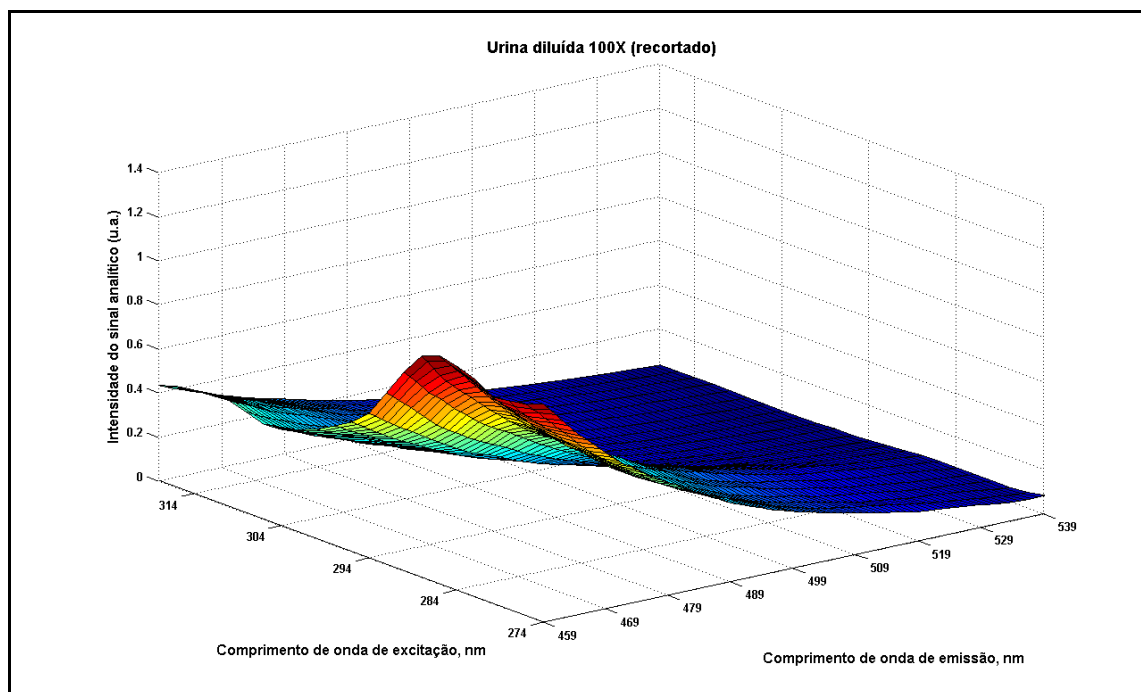


Figura 37: Superfície de fluorescência de urina diluída 100 vezes

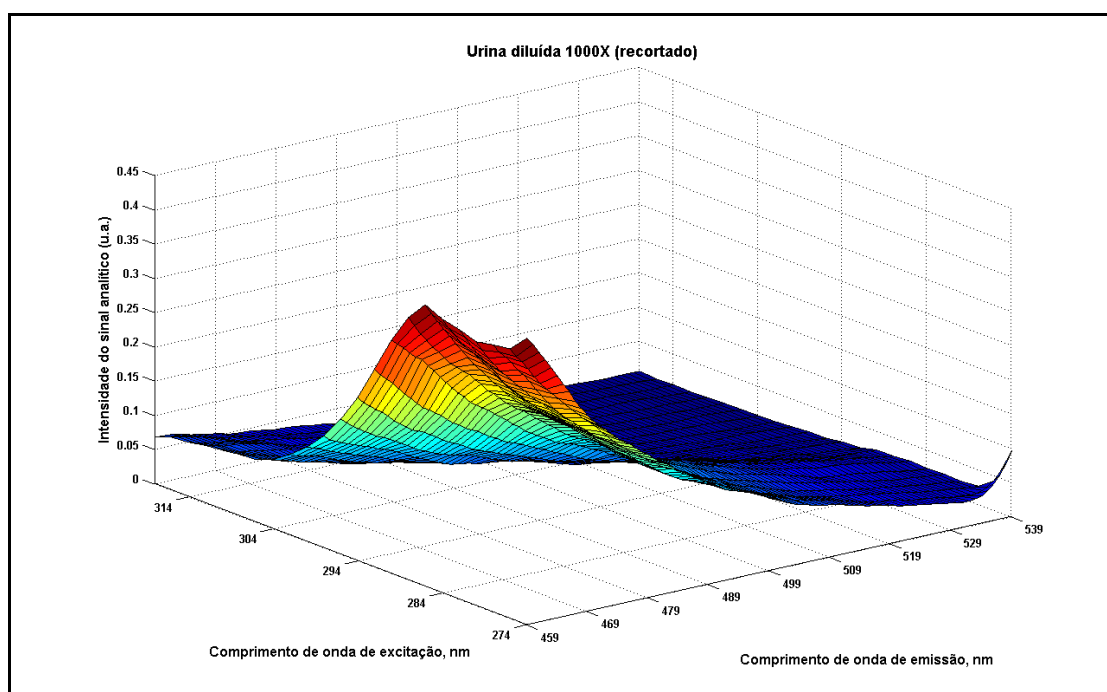


Figura 38: Superfície de fluorescência de urina diluída 1000 vezes

Quando misturava-se o analito à urina, o sinal de fluorescência da urina suprimia quase totalmente o do antibiótico, conforme mostrado na figura 39:.

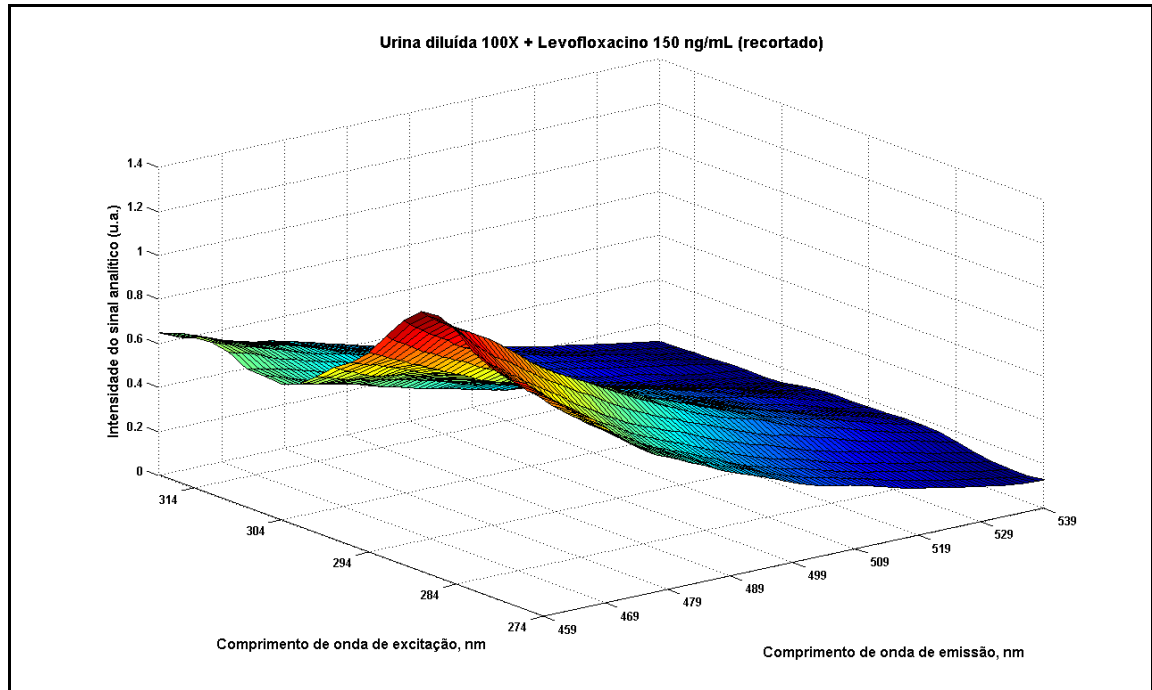


Figura 39: Superfície de fluorescência de urina diluída 100 vezes com levofloxacino 150 ng/mL

Somente com uma nova diluição, desta vez de 1000 vezes, era possível observar a redução do sinal da urina e o aumento do sinal do fármaco, como aparece na figura 40.

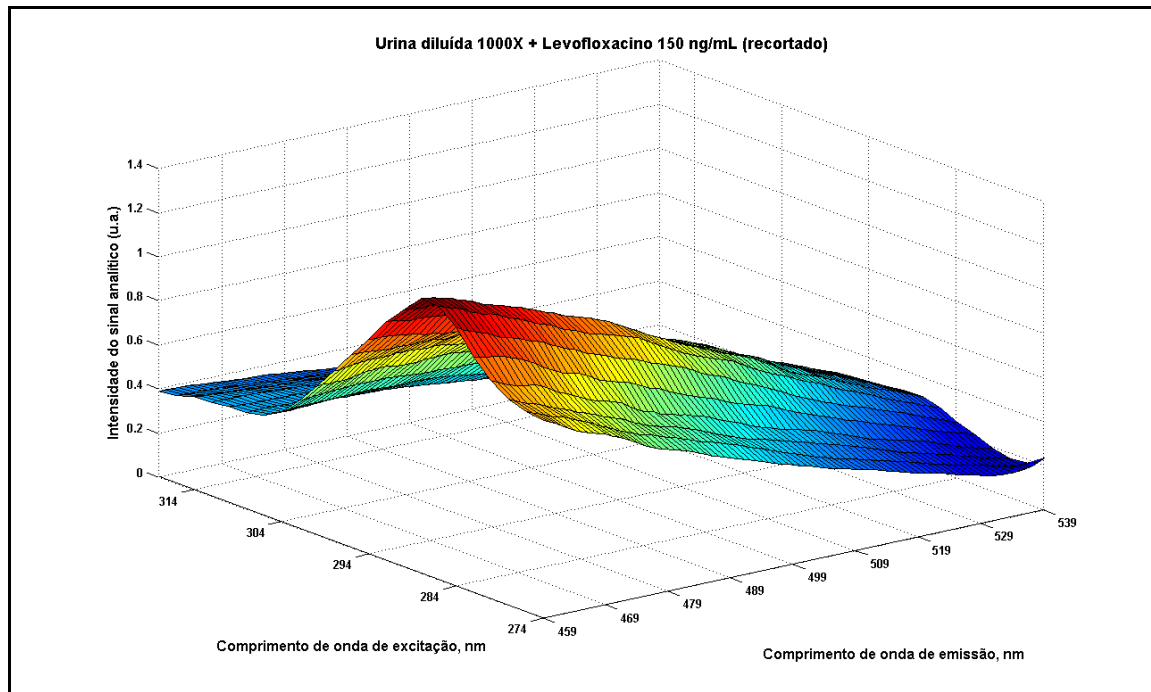


Figura 40: Superfície de fluorescência de urina diluída 1000 vezes + 150 ng/mL de levofloxacino

Na tentativa de se fazer uma curva analítica desta amostra pelo método univariado, notou-se que não havia linearidade no sistema. Então, optou-se por fazer análise dos dados para a urina com levofloxacino utilizando o PARAFAC, um método de calibração de ordem superior, utilizando o MATLAB.

Ao fazer a análise e comparar o número de fatores (2 ou 3), percebeu-se que seriam necessários mais parâmetros para fazer essa escolha, já que ambos os casos apresentavam bons resultados, como mostram as figuras 41 e 42:

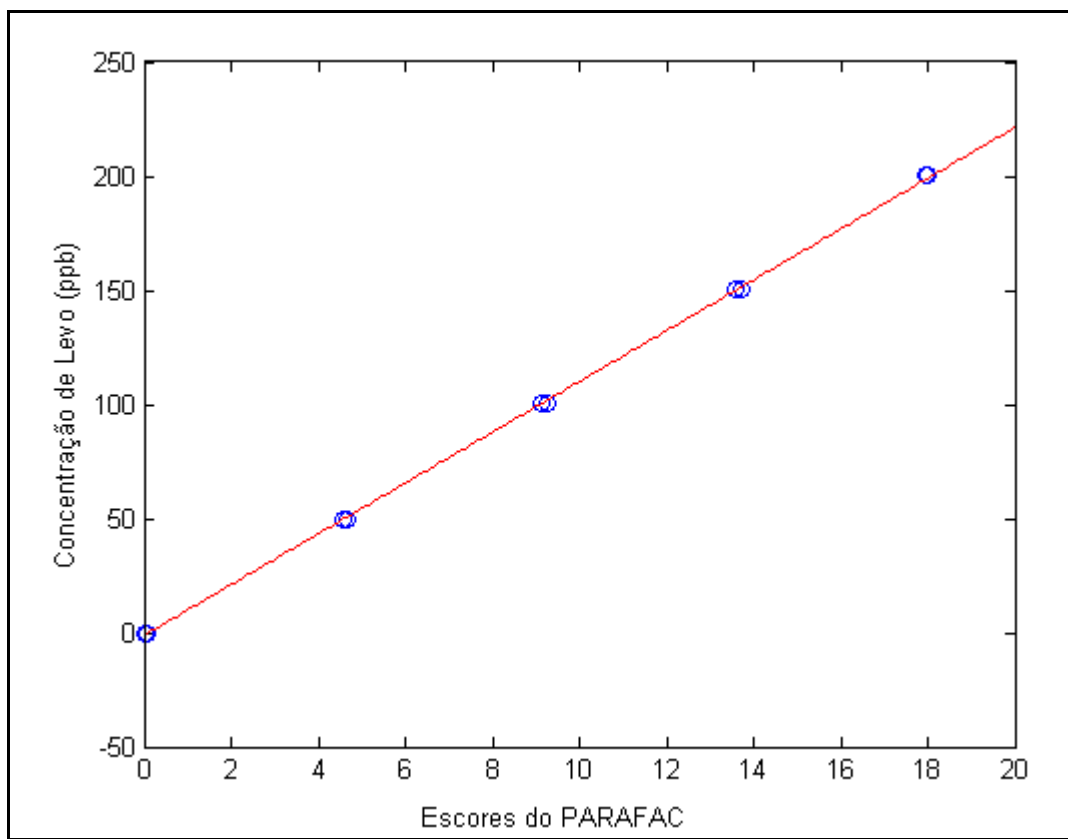


Figura 41: Curva analítica de levofloxacino com dois fatores.

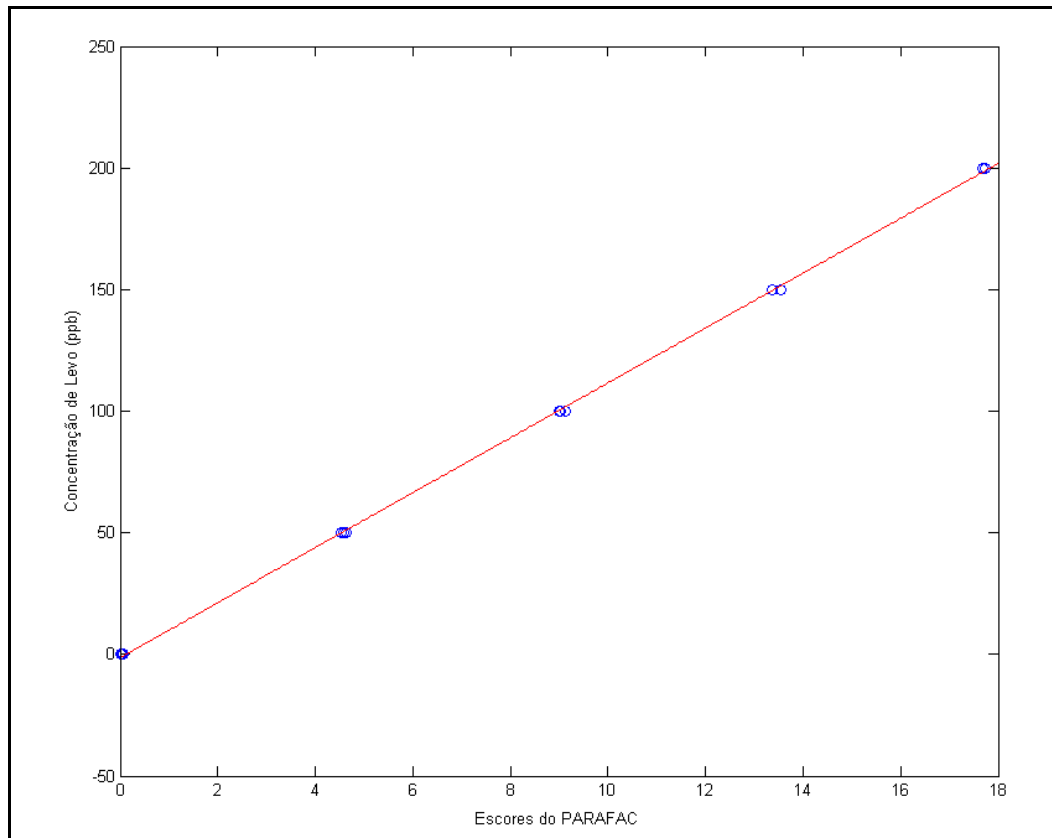


Figura 42: Curva analítica de levofloxacino com três fatores.

O fator que definiu a escolha do número de variáveis latentes foi o CONCORDIA. Como foi dito anteriormente, ele por si só não define o número de variáveis, porém, é uma das ferramentas nesta escolha.

A figura 43 mostra a análise dos dados para duas variáveis latentes. Nota-se que, além de o modelo ser explicado para 99,56% dos casos, ele apresenta 100% de consistência trinlear.

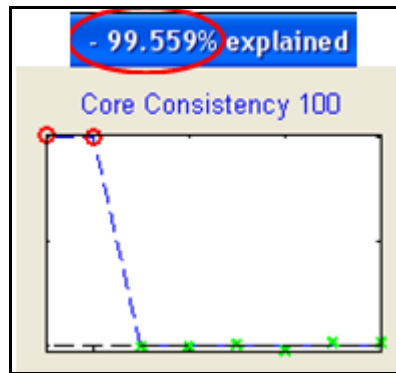


Figura 43: PARAFAC de urina com levofloxacino- duas variáveis latentes.

A figura 44 mostra o resultado para três variáveis latentes. Pode-se observar que, embora o modelo seja explicado em 99,647% dos casos, o valor do teste de consistência dele é inferior a zero, o que indica inconsistência trilinear. Comparativamente com o outro modelo, este leva desvantagem, que neste caso evidenciou que o melhor modelo era o com duas variáveis.

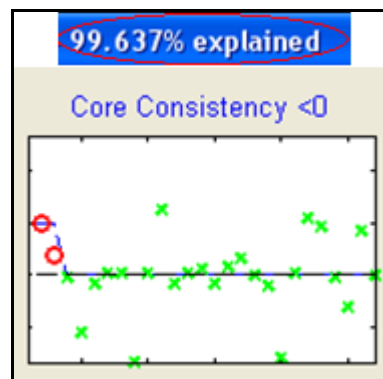


Figura 44: PARAFAC de urina com levofloxacino- três variáveis latentes.

Quando as matrizes resultantes do PARAFAC processaram amostras junto com o conjunto calibração, os perfis de excitação e emissão foram apresentados nas figuras 45 e 46, nas quais os componentes foram rotulados de acordo com sua atribuição ao modelo. Eles aparecem de acordo com sua contribuição na variância total, e neste caso particular, a interferência surge na primeira figura, o que indica que esta é a principal

fonte de intensidade fluorescente neste quadro. Comparações com espectros de emissão e excitação experimentais mostram, nas mesmas figuras para soluções de padrão permitem concluir que o componente 1 é o levofloxacino e o componente 2 é a urina humana.

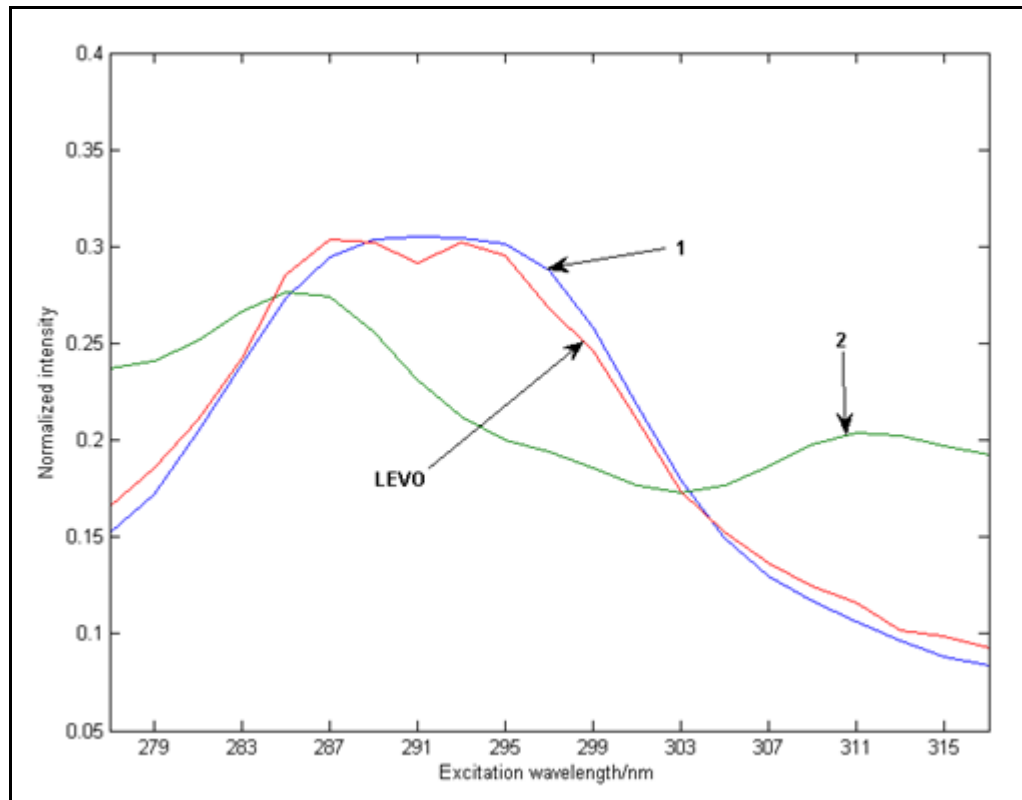


Figura 45 – Perfis de excitação originados de um modelo PARAFAC com dois componentes, usado para processar o tensor formado pelo conjunto de amostras e as nove amostras de urina humana com adição de padrão.

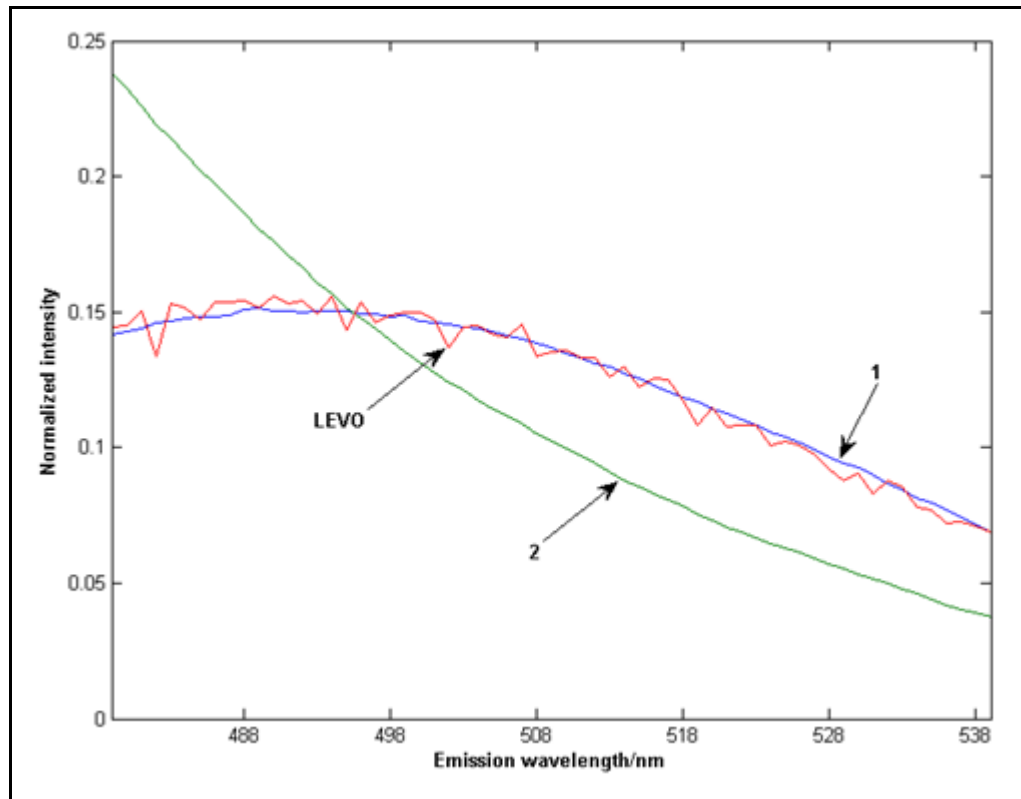


Figura 46 – Perfis de emissão originados de um modelo PARAFAC com dois componentes, usado no processo de formação de um tensor com as amostras e as 9 amostras de urina humana com adição de padrão.

Inicialmente a análise seria feita juntando o conjunto calibração, composto pelos padrões do analito puro em água mais o branco, adicionando-se o conjunto da amostra de urina enriquecida com levofloxacino para a criação do tensor. Depois de fazer a deconvolução dos espectros de fluorescência pelo PARAFAC, foram construídas as curvas analíticas. No entanto, ao se fazer a construção do gráfico de dispersão, este se apresentava com dois conjuntos de dados, como mostra a figura 47.

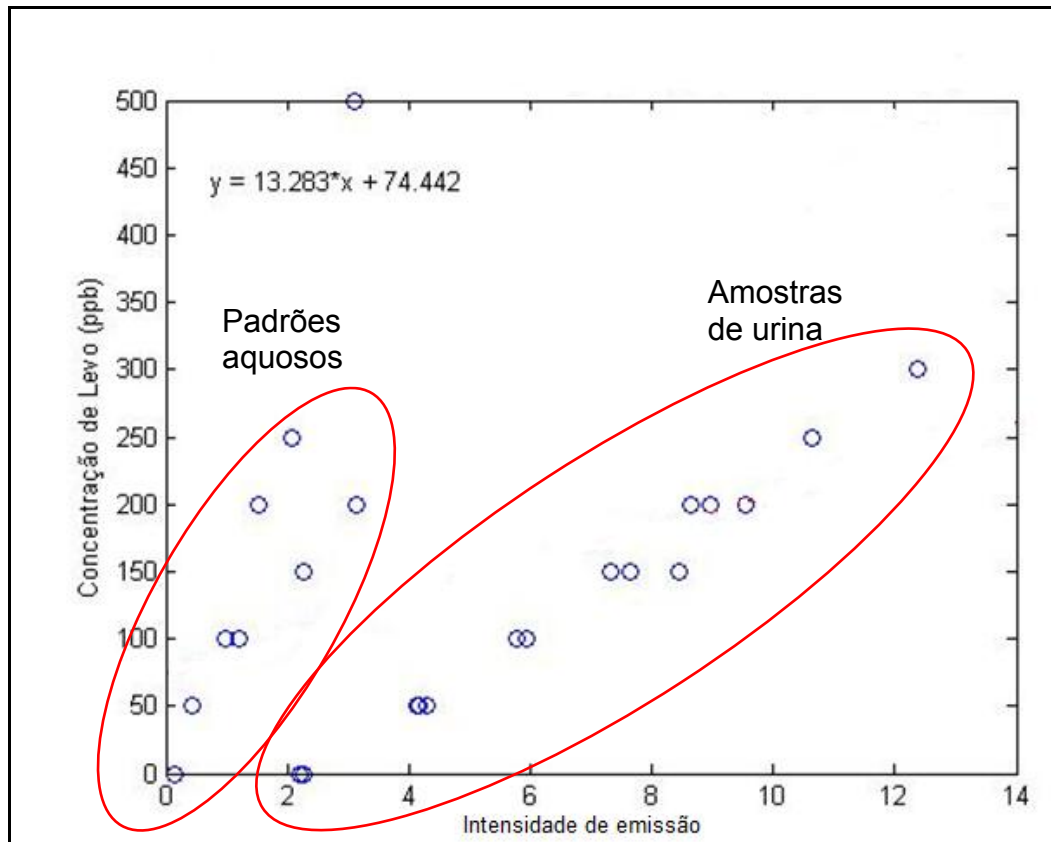


Figura 47: Curva analítica da amostra com urina e levofloxacino

Diante do ocorrido, notou-se que o conjunto calibração proposto formava uma curva analítica e, o conjunto de amostras com urina formava outro conjunto. Para resolver este problema, decidiu-se pela retirada do conjunto calibração que era composto apenas por soluções aquosas do padrão de levofloxacino.

Para a urina de um paciente saudável, o uso combinado da Análise dos Fatores Paralelos com o método da adição de padrão forneceu os teores de antibiótico indicados na tabela 8, utilizando zero como valor de referência:

Tabela 8: Teores de antibiótico em cada diluição:

Urina (diluição)	Teor de levofloxacino calculado (ng/mL)
100 x	11,2
500 x	6,0
1000 x	1,3

A tabela 9 mostra os parâmetros de mérito do estudo para os três níveis de diluição:

Tabela 9: Parâmetros de mérito obtidos nos três níveis de diluição:

Parâmetros de Mérito	Diluições utilizadas		
	100 x	500 x	1000 x
RMSEC	7,1	4,1	1,2
REP	8,53	Inf	Inf
y_{un}	11,2	6,0	1,3
SE_uni	3,6	1,7	0,5
leverage_un	0,002	3,39 E -4	2,12 E -5
LD	1,7	6,61 E +14i	1,07 E +15i
LQ	5,2	2,00 E +15i	3,24 E +15i

Onde i = valor imaginário

A redução dos valores encontrados para o erro médio e erro médio relativo do modelo (RMSEC e REP, respectivamente), assim como do erro padrão da estimativa da concentração (SE_uni), indicam uma melhora na precisão do modelo com o aumento da diluição das amostras. Os valores das concentrações estimadas das amostras (y_{un}) também foram diminuindo com o aumento da diluição, o que é indicativo da melhora da exatidão do método.

O pequeno valor da influência da amostra no modelo (leverage_un) indica que não há amostras com resultados inconsistentes (“outliers”). Os valores dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) mostram que o valor da concentração estimada pelo modelo é aceitável.

9 CONCLUSÃO

Segundo os resultados mostrados, o objetivo principal do trabalho, que era quantificar o levofloxacino e obter a resolução de seu espectro em diferentes matrizes, usando calibração multivariada de ordem superior e adição de padrão, foi alcançado.

Nos estudos preliminares, utilizou-se o método univariado com espectrofluorescência. A faixa de trabalho de 28,8 – 108,8 ng/mL mostrou que o método conservou sua linearidade, com coeficientes de correlação e determinação iguais a 0,999 e 0,998, respectivamente. A determinação do analito em medicamento ocorreu de satisfatória, este apresentou média dos erros absoluto e relativo e seus desvios padrão de $-0,5 \pm 0,9$ e $-6,7 \pm 22,3$, respectivamente. Seus valores indicaram que a exatidão dos resultados não estava satisfatória, devido à pequena faixa de concentração utilizada nos experimentos, o que foi melhorado nos estudos conclusivos.

Ainda nos estudos preliminares, utilizou-se o método univariado combinado com HPLC. O sinal do analito manteve-se linear na faixa de concentração de 2,9 – 10,8 $\mu\text{g/mL}$, com $r = 0,996$ e $r^2 = 0,991$. A determinação do levofloxacino no medicamento ocorreu com média dos erros absoluto e relativo seus desvios padrão de $-0,5 \pm 0,7$ e $8,7 \pm 11,8$ e, como no caso da fluorescência molecular, indicou que a exatidão dos resultados não estava satisfatória. Isto também ocorreu em decorrência da pequena faixa de concentração utilizada nos experimentos, que também foi melhorada nos estudos conclusivos.

Apesar da pouca exatidão dos resultados, o teste F realizado indicou que os métodos eram concordantes e obtêm respostas semelhantes para um mesmo nível de concentração.

A quantificação de urina de paciente em tratamento, feita nos estudos preliminares, evidenciou a falta de equivalência dos resultados obtidos por fluorescência e HPLC. A urina amplifica o sinal de fluorescência do levofloxacino e faz com que o método obtenha resultados muito discrepantes da realidade, o que confirmou a necessidade da utilização de outro método concomitante à fluorescência molecular para que se tivesse melhores resultados.

Nos estudos conclusivos, a quantificação de levofloxacino em medicamentos usando calibração de ordem zero e PLS mostrou resultados mais satisfatórios para o primeiro método. A maior discrepância nos dados, evidenciada por um desvio padrão de 7,9% (em comparação com o desvio de 2,0% do primeiro método), indicou que a calibração de primeira ordem em nada melhorou os resultados da calibração de ordem zero.

A determinação de levofloxacino em urina utilizando PARAFAC (método de segunda ordem) apresentou problemas na calibração. Quando se utilizavam matrizes diferentes (água pura e urina), obtinham-se dois conjuntos de calibração com inclinações distintas. O problema foi resolvido retirando-se o conjunto de calibração dos padrões aquosos. O segundo problema a ser resolvido, foi a escolha da quantidade de variáveis latentes, já tanto duas variáveis quanto três apresentavam bons resultados. A escolha foi feita baseada no estudo da consistência trilinear do modelo, enquanto com duas variáveis ele apresentava 100% de consistência, com três, esta ficava inferior a zero. Então, o modelo com duas variáveis latentes foi o escolhido. Portanto, tornou-se necessário a combinação do SOSAM com o PARAFAC para a quantificação do levofloxacino em amostra de urina.

Resolvidos os problemas, a metodologia obteve ótimos resultados. Sua função, que era identificar e quantificar a substância em uma amostra complexa, sem necessidade de tratamento prévio foi devidamente cumprida. A quantificação do medicamento se mostrou mais precisa e exata com o aumento da diluição da urina, fato confirmado com os valores dos parâmetros de mérito.

10 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento de novos métodos de análise de fármacos aplicados em medicamentos, fluidos corporais, entre outros;
- Utilização de ambiente micelar para intensificar o sinal luminescente.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ANDRIOLE, V. T., *The Quinolones*, 3.ed., Elsevier, 2000.

ALTIOKKA G., ATKOSAR Z., CAN N. O., *“The Determination of Levofloxacin by Flow Injection Analysis Using UV Detection, Potentiometry, and Conductometry in Pharmaceutical Preparations”*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.30, p. 881-885, 2002;

ANDRESSON C. A., BRO R., *“The N-way Toolbox for MATLAB”*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 52, p. 1, 2000;

ARANCIBIA, J. A., ESCANDAR G. M., *“Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum”*, *Talanta*, v. 6, p. 1113-1121, 2003;

BEDOR D. C.G., GONÇALVES T. M., BASTOS L. L., SOUSA C.E. M., ABREU L. R. P., OLIVEIRA E. J., SANTANA D. P., *“Development and Validation of a New Method for the Quantification of Norfloxacin by HPLC-UV and its Application to a Comparative Pharmacokinetic Study in Human Volunteers”*, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 231- 238, 2007;

BRAGA J. W. B., POPPI R. J., *“Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo”*, *Química Nova*, v.27, p. 1004-1011, 2004;

BELAL F., AL-MAJED A.A., AL-OBAID A.M., *“Methods of Analysis of 4-quinolone antibacterials”*, *Talanta*, v. 50, p. 765-786, 1999;

BRERETON R.G., *“Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry”*, *Analyst*, v.125, p.2125-2154, 2000;

British Pharmacopeia, vol.1, Her Majesty's Stationary Office, London, p. 369-370, 1034-1035, 1999;

BRO, R., "*Multiway calibration. Multilinear PLS*", Journal of Chemometrics, v.10, p.47-61, 1996.

BRO, R., "*PARAFAC. Tutorial and applications*", Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 38, p. 149-171, 1997;

BRO R., *Multi-way Analysis in the Food Industry*. 1998. 298 f. Tese (Doutorado Calibração Multivariada)- Universidade de Amsterdam, Holanda, 1998;

BRO R., "*A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models*", Journal of Chemometrics, v. 17, p. 274-286, 2003;

BROOKSH K. S., KOWALSKY B. R., "*Theory of analytical chemistry*", v. 66, p.782A-791A, 1994;

CASAVANT M.J., SHAH M. N., BATTELS R., "*Does Fluorescent Urine Indicates Antifreeze Ingestion by Children?*", Pediatrics, v. 107, p. 113-114, 2001;

CÓRDOBA- BORREGO M., CÓRDOBA- DÍAZ M., CÓRDOBA- DÍAZ D., "*Validation of a High-performace Liquid Chromatographic Method for the Determination of Norfloxacin and its Application to Stability Studies (Photo-stability Study of Norfloxacin)*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 18, p. 919-926, 1999;

DAMIANI, P. C., NEPOTE A. J., BEARZOTTI M., OLIVIERI A. C., "*A Test Field for the Second-Order Advantage in Bilinear Least-Squares and Parallel Factor Analyses: Fluorescence Determination of Ciprofloxacin in Human Urine*", Analytical Chemistry, v. 76, p. 2798-2806, 2004;

DU L. M., YANG Y. Q., WANG Q. M., “*Spectrofluorimetric Determination of Certain Quinolone through Charge Transfer Complex Formation*”, *Analytica Chimica Acta*, v.516, p. 237-243, 2004;

FARIA A. F., SOUZA M. V. N., ALMEIDA M. V., OLIVEIRA M. A. L., “*Simultaneous Separation of Five Fluoroquinolone Antibiotics by Capillary Zone Electrophoresis*”, *Analytica Chimica Acta*, v. 579, p. 185-192, 2006;

FINETE V.L. M., “*Desenvolvimento de métodos Espectrofluorimétricos para a Determinação de Enritromicina e Canamicina e Aplicabilidade na Vacina Contra Febre Amarela*”, 2005. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Brasil, 2005;

FLURER C.L., “*Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis*”, *Eletrophoresis*, v. 18, p.2427-2437, 1997;

FRATINI L., SCHAPOVAL E.E.S., “*Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron(III)nitrate*”, *International Journal of Pharmaceutics*, v.127, p. 279-282, 1996;

GONZÁLEZ J.A.O., MOCHÓN M.C., LA ROSA F.J.B, “*Spectrofluorimetric Determination of Levofloxacin in Tablets, Human urine and Serum*”, *Talanta*, v. 52, p. 1149-1156, 2000;

GONZÁLEZ J.A.O., MOCHÓN M.C., LA ROSA F.J.B, “*Simultaneous Determination of Cefepime and the Quinolones Garenoxacin, Moxifloxacin and Levofloxacin in Human Urine by HPLC-UV*”, *Microchimica Acta*, v. 151, p. 39-45, 2005;

JI H. Y., JEONG W. D., KIM Y.H., KIM H., SOHN D., LEE H.S., “*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry for the Determination of*

Levofloxacin in Human Plasma”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.41, p.622-627, 2006;

JOSHI S., “*HPLC Separation of Antibiotics Present in Formulated and Unformulated Samples*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 28, p.795-809, 2002

<http://laqqa.igq.unicamp.br/PLS.HTML>

LAKOWICZ J.R., “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, p.1 e p.30, Springer, 3^o edition, 2006;

LIANG H., KAYS M. B., SOWINSKI K. M., “*Separation of Levofloxacin, Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Trovafloxacin and Cinoxacin by High-performance Liquid Chromatography: Application to Levofloxacin Determination in Human Plasma*”, Journal of Chromatography B, v. 772, p. 53-63, 2002;

LIU Y. M., CAO J. T., TIAN W., ZHENG Y. L., “*Determination of Levofloxacin and Norfloxacin by Capillary Electrophoresis with Electrochemiluminescence Detection and Applications in Human Urine*”, Electrophoresis, v. 29, p. 3207-3212, 2008;

MANDELL L.A., PETERSON L.R., WISE R., HOOPER D., LOW D.E., SHAAD U.B., KLUGMAN K.P., COURVALIN P., “*The battle against emerging antibiotic resistance: should fluoroquinolones be used in children?*”, Clinical Infectious Diseases, v.35 p.721–727, 2002;

MARTENS H., NAES T., Multivariate Calibration, Wiley:Chichester,1989;

MENDHAM J., DENNEY R.C., BARNES J. D., THOMAS M. J. K., “*Voguel: Análise Química Quantitativa*”, p. 462, LTC, 6^a edição, 2002;

NECKEL U., JOUKHADAR C., FROSSARD M., JAGER W., MULLER M., MAYER B. X., *“Simultaneous Determination of Levofloxacin and Ciprofloxacin in Microdialysates and Plasma by High-performance Liquid Chromatography”*, *Analytica Chimica Acta*, v. 463, p. 199-206, 2002;

NIKOLAJSEN R. P. H., BOOKSH K. S., HANSEN A. M., BRO R., *“Quantifying catecholamines using multi-way kinetic modelling”*, *Analytica Chimica Acta*, v. 475, p.137-150, 2003;

OCANÑA J. A., BARRAGÁN F. J., CALLEJÓN M., DE LA ROSA F., *“Application of Lanthanide-Sensitised Chemiluminescence to the Determination of Levofloxacin, Moxifloxacin and Trovafloxacin in Tablets”*, *Microchimica Acta*, v. 144, p. 207-213, 2004;

OLIVIERI A. C., ARANCIBIA J. A., MUÑOZ DE LA PEÑA A., DURÁN-MERÁS I., MANSILLA A. E., *“Second-Order Advantage Achieved with Four-Way Fluorescence Excitation–Emission–Kinetic Data Processed by Parallel Factor Analysis and Trilinear Least-Squares. Determination of Methotrexate and Leucovorin in Human Urine”*, *Analytical Chemistry*, v.76, p. 5657-5666, 2004;

RADI A., EL-SHERIF Z., *“Determination of Levofloxacin in Human Urine by Adsorptive Square-wave Anodic Stripping Voltammetry on a Glassy Carbon Electrode”*, *Talanta*, v.58, p. 319-324, 2002;

RENDELL D., *“Fluorescence and Phosphorescence (Analytical Chemistry by Open Learning)”*, p.3, Crown Copyright, 1987;

RIBANI M., BOTTOLI C.B.G., MELO L. F. C., *“Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos”*, *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004;

SALEM H., *“Spectrofluorimetric, Atomic Absorption Spectrometric and Spectrophotometric Determination of Some Fluorquinolones”*, *American Journal of Applied Sciences*, v. 3, p.719-729, 2005;

SAMANIDOU V.F., DEMETRIOU C.E., PAPADOYANNIS I.N., *“Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC”*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.375, p. 623-629, 2003;

SANTORO M.I.R.M., *“Quantitative Determination of Gatifloxacin, Levofloxacin, Lomefloxacin and Pefloxacin Fluoroquinolonic Antibiotics in Pharmaceutical Preparations by High-performance Liquid Chromatography”*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.40, p. 179-184, 2006;

SCHULMAN, S.G., *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice*, 1 ed., New York: Pergamon Press, 1977;

SENA M. M., TREVISAN M. G., POPPI R.J., *“PARAFAC: uma Ferramenta Químiométrica para Tratamento de Dados Multidimensionais , Aplicações na Determinação Direta de Fármacos em Plasma Humano por Espectrofluorimetria”*, Química Nova, v.28, p. 910-920, 2005;

SIEWERT S., *“Validation of a Levofloxacin HPLC Assay in Plasma and Dialysate for Pharmacokinetic Studies”*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1360-1362, 2006;

SKOOG D. A., HOLLER F. J., NIEMAN T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman, Porto Alegre, 2002;

SOUSA I. C. S. C., *“Interacção da Enrofloxacin com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas”*, 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar)- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, 2007

SUN S.W., CHEN L.Y., *Journal of Chromatography A*, “*Optimization of Capillary Electrophoretic Separation of Quinolone Antibacterials Using the Overlapping Resolution Mapping Scheme*”, v. 766, p. 215-224, 1997;

The United States Pharmacopoeia, 25^a rev., U.S.P. Convention: Rockville, 2002;

TSAI, Y.-H., BAIR, M.-J. AND HU, C.-C.; “*Determination of Levofloxacin in Human Urine with Capillary Electrophoresis and Fluorescence Detector*”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, v.54, p.991-995, 2007;

United States Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2748-2751, ed.28, 2005;

VALDERRAMA P., BRAGA J. W. B., POPPI R. J., “*Estudo da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada*”, *Química Nova*, v. 32, p. 1278-1287, 2009;

VO-DINH, T., *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, New York: Wiley Interscience, 1984;

WANG L., YANG P., LI Y., CHEN H., LI M., LUO F., “*A Flow Injection Chemiluminescence Method for the Determination of Fluorquinolone Derivate Using the Reaction of Luminol and Hydrogen Peroxide Catalyzed by Gold Nanoparticles*”, *Talanta*, v. 72, p. 1066-1072, 2007;

WONG F. A., JUZWIN S. J., FLOR S. C., “*Rapid Stereospecific High-performance Liquid Chromatographic Determination of Levofloxacin in Human Plasma and Urine*”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 15, p. 765-771, 1997;