



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de Método Analítico por Espectroscopia  
de Fluorescência para Determinação de Bisfenol A**

**Caroline Zabotti**

Toledo – PR, 2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de Método Analítico por Espectroscopia  
de Fluorescência para Determinação de Bisfenol A**

**Caroline Zabotti**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

**Orientador(a): Prof. Dr. Reinaldo A. Bariccatti**  
**Co-orientador(a): Prof. Dr. Cleber A. Lindino**

Toledo – PR, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Zabotti, Caroline  
Desenvolvimento de Método Analítico por Espectroscopia de Fluorescência para Determinação de Bisfenol A / Caroline Zabotti; orientador(a), Reinaldo Aparecido Baricatti; coorientador(a), Cleber Antonio Lindino, 2018. 90 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

1. Espectroscopia de Fluorescência. 2. Complexos de inclusão. 3. Ciclodextrina. 4. Bisfenol A. I. Baricatti, Reinaldo Aparecido. II. Lindino, Cleber Antonio. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

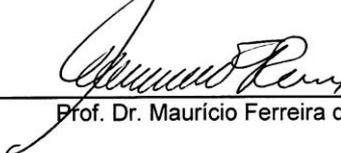
Caroline Zabotti

**“Desenvolvimento de método analítico por espectroscopia de fluorescência para determinação de bisfenol A”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:



Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti (Presidente-Orientador)



Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa (Unioeste)



Profa. Dra. Eliane Colla (UTFPR)

Aprovada em: 31 de julho de 2018.

Local de defesa: Miniauditório do Gerpel – Unioeste/Campus de Toledo.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 - INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2 - OBJETIVOS .....   | 16 |
| 2.1 - OBJETIVOS GERAIS .....  | 16 |
| 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 16 |
| 3 – REFERENCIAL TEÓRICO .....   | 17 |
| 3.1 – BISFENOL A .....  | 17 |
| 3.1.1 – Características químicas .....  | 17 |
| 3.1.2 – Efeitos na saúde e no ambiente .....  | 18 |
| 3.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BFA .....  | 21 |
| 3.2.1 - Espectroscopia de fluorescência molecular .....   | 21 |
| 3.3 - FORMAÇÃO DE COMPLEXO DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA .....                                      | 24 |
| 4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....  | 28 |
| 4.1 – TESTE DE SOLUBILIDADE PARA O BFA E $\beta$ CD .....   | 28 |
| 4.2 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DA ABSORÇÃO E DA EMISSÃO .....                      | 29 |
| 4.3 – CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BFA .....                                 | 29 |
| 4.4 – ESTUDO UNIVARIADO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO .....   | 30 |
| 4.5 – ESTUDO MULTIVARIADO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO .....   | 31 |
| 4.6 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....  | 33 |
| 5 – RESULTADOS .....  | 34 |
| 5.1 – TESTE DE SOLUBILIDADE .....   | 34 |
| 5.2 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO ESPECTROFOTÔMETRO E DO ESPECTROFLUORÍMETRO ..... | 36 |
| 5.3 – ESTUDO UNIVARIADO – INVESTIGAÇÃO DAS FLUTUAÇÕES NA CURVA ANALÍTICA .....                      | 44 |
| 5.3.1 - Avaliação da temperatura .....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.2 - Avaliação do efeito do pH .....                               | 46 |
| 5.3.3 - Avaliação da força iônica .....                               | 50 |
| 5.3.4 - Avaliação da $\beta$ CD .....                                 | 51 |
| 5.4 – ESTUDO MULTIVARIADO .....                                       | 55 |
| 5.4.1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) $2^3$ .....   | 55 |
| 5.5 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....                        | 64 |
| 5.5.1 – Ajuste modelo linear.....                                     | 64 |
| 5.5.2 – Seletividade e efeito matriz .....                            | 76 |
| 5.5.3 – Exatidão .....  | 80 |
| 5.5.4 – Precisão .....  | 81 |
| 5.5.5 – Intervalo, limite de detecção e limite de quantificação ..... | 83 |
| 5.5.6 – Robustez .....  | 84 |
| 5.5.7 – Estabilidade das soluções.....                                | 85 |
| 5.5.8 – Observações .....   | 85 |
| 6.0 – CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                          | 87 |
| 6.1 – CONCLUSÃO .....   | 87 |
| 6.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                       | 87 |
| 7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                | 88 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise da Variância

ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária

$\beta$ CD –  $\beta$ -Ciclodextrina

BFA – Bisfenol A

CDs – Ciclodextrinas

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DPR – Desvio padrão relativo

FDA - *Food and drug administration*

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários

MMQP – método dos mínimos quadrados ponderados

PC – Policarbonato

ppm – Parte por milhão

PVC – Cloreto de polivinila

USP – United States Pharmacopeia

$\lambda_{\text{máx}}$  – Comprimento de onda máximo

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 3.1: Propriedades físico-químicas do BFA [9,11,12].....   | 18 |
| Tabela 3.2: Propriedades CDs [49]. .....   | 26 |
| Tabela 4.1: Construção da curva analítica de BFA. ....   | 30 |
| Tabela 4.2: Variáveis do DCCR para o estudo da intensidade da fluorescência de BFA (níveis reais e codificados). .....   | 31 |
| Tabela 4.3: Variáveis do DCCR 2 <sup>3</sup> com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas na intensidade da fluorescência de BFA. .... | 32 |
| Tabela 5.1: Dados de solubilidade para o BFA e $\beta$ CD. ....  | 34 |
| Tabela 5.2: Construção da curva analítica de BFA. ....   | 43 |
| Tabela 5.3: Variáveis do DCCR 2 <sup>3</sup> com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas sobre a fluorescência de BFA. ....           | 56 |
| Tabela 5.4: Análise dos efeitos das variáveis do planejamento 2 <sup>3</sup> sob a fluorescência. ....   | 57 |
| Tabela 5.5: Coeficientes de regressão do modelo quadrático para a resposta intensidade de fluorescência. ....  | 58 |
| Tabela 5.6: ANOVA do modelo quadrático para área fluorescência. ....   | 59 |
| Tabela 5.7: Teste Grubbs.....  | 62 |
| Tabela 5.8: Tabela Grubbs.....   | 62 |
| Tabela 5.9: Curva calibração 1.....  | 64 |
| Tabela 5.10: Linearidade 1.....  | 65 |
| Tabela 5.11: Curva calibração 2.....   | 67 |
| Tabela 5.12: Linearidade 2.....  | 67 |
| Tabela 5.13: ANOVA modelo linear. ....   | 69 |
| Tabela 5.14: Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto. ....   | 69 |
| Tabela 5.15: Medida descritiva da qualidade do ajuste.....   | 70 |
| Tabela 5.16: Teste de Normalidade. ....  | 71 |
| Tabela 5.17: Teste de homocedasticidade.....   | 71 |
| Tabela 5.18: Critérios avaliação de pontos influentes. ....  | 75 |
| Tabela 5.19: Pontos Influentes (DFBETA). ....  | 75 |
| Tabela 5.20: Pontos Influentes (DFFIT). ....   | 75 |
| Tabela 5.21: Pontos Influentes (DCOOK). ....   | 75 |
| Tabela 5.22: Avaliação quantitativa da seletividade no UV-Vis.....   | 78 |

|   |    |
|---|----|
| Tabela 5.23: Avaliação quantitativa da seletividade na fluorescência..... | 79 |
| Tabela 5.24: Avaliação da exatidão do método analítico. ....              | 81 |
| Tabela 5.25: Avaliação da repetibilidade do método analítico.....         | 82 |
| Tabela 5.26: Avaliação do sinal/ruído. ....                               | 84 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.1: Reação de obtenção do BFA. Adaptado de [1].   | 17 |
| Figura 3.2: Diagrama de Jablonski [37].   | 22 |
| Figura 3.3: Estrutura das $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ – Ciclodextrina [48].   | 25 |
| Figura 3.4: Esquema da estrutura funcional das CDs [48].  | 25 |
| Figura 5.1: Sobreposição dos espectros na região do UV-VIS das soluções de trabalho de BFA.   | 37 |
| Figura 5.2: Sobreposição dos espectros na região do UV-Vis das soluções de trabalho de BFA com $\beta$ CD.  | 38 |
| Figura 5.3: Relação entre as variáveis concentração de BFA, BFA+ $\beta$ CD <i>versus</i> Absorbância.  | 39 |
| Figura 5.4: Sobreposição dos espectros de fluorescência das soluções de trabalho de BFA.  | 40 |
| Figura 5.5: Sobreposição dos espectros de fluorescência das soluções de trabalho de BFA com $\beta$ CD.   | 41 |
| Figura 5.6: Relação da intensidade de fluorescência para BFA com e sem $\beta$ CD.  | 42 |
| Figura 5.7: Relação da intensidade de fluorescência de BFA + $\beta$ CD.  | 43 |
| Figura 5.8: Espectros de emissão do complexo de BFA + $\beta$ CD (7,5 ppm) em função da temperatura.  | 45 |
| Figura 5.9: Espectros de emissão do complexo de BFA + $\beta$ CD (7,5 ppm) em função do pH.   | 47 |
| Figura 5.10: Distribuição das espécies de BFA em função do pH [64].   | 48 |
| Figura 5.11: Distribuição das espécies de $\beta$ CD em função do pH [64].  | 49 |
| Figura 5.12: Espectros de emissão do complexo de BFA + $\beta$ CD (7,5 ppm) em função da força iônica.  | 50 |
| Figura 5.13: Sobreposição dos espectros na região do UV-Vis das soluções de trabalho de BFA com 0,006 mol.L <sup>-1</sup> de $\beta$ CD.  | 52 |
| Figura 5.14: (a) Sobreposição dos espectros de emissão das soluções de trabalho de BFA com 0,006 mol.L <sup>-1</sup> de $\beta$ CD (b) Intensidade de fluorescência de BFA sem e com 0,006 mol.L <sup>-1</sup> de $\beta$ CD. | 54 |
| Figura 5.15: Sobreposição dos espectros de emissão do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> .  | 60 |
| Figura 5.16: Gráfico de resíduos do ajuste do modelo quadrático.  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 5.17: Avaliação resíduos teste G. ....   | 63 |
| Figura 5.18: Curva analítica obtida no espectrofluorímetro. ....  | 66 |
| Figura 5.19: Faixa linear da curva de emissão de BFA + $\beta$ CD.....  | 68 |
| Figura 5.10: Análise resíduos padronizados (a) e resíduos studentizados (b). ....                                     | 73 |
| Figura 5.21: Gráfico da Análise dos Resíduos. ....  | 74 |
| Figura 5.22: Avaliação de pontos influentes.....  | 76 |
| Figura 5.23: Espectro UV-Vis da água de torneira contaminada para avaliação da seletividade. ....                     | 77 |
| Figura 5.24: Sobreposição dos espectros de emissão da água de torneira contaminada para análise da seletividade. .... | 78 |
| Figura 5.25: Avaliação do limite de detecção. ....  | 83 |

# DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A

Caroline Zabotti

## RESUMO

Metodologias analíticas para a quantificação de bisfenol A são desenvolvidas com um objetivo em comum, que é realizar o monitoramento deste composto em diversas matrizes. Este monitoramento se faz necessário pelo fato deste composto ser um poluente ambiental que apresenta efeitos indesejáveis na saúde. No trabalho em questão, foi investigado a aplicação do complexo de inclusão de bisfenol A com  $\beta$ -ciclodextrina para determinação de níveis traço em solução aquosa por espectrofluorimetria. O uso do encapsulamento molecular da  $\beta$ -ciclodextrina com o analito de interesse proporcionou uma alta sensibilidade de detecção (0,03 ppb) devido a formação do complexo de inclusão, o qual proporcionou maior rigidez para a molécula de bisfenol A e conseqüentemente, aumento na resposta de intensidade de fluorescência, sem interferências de ruído ou sinal analítico prejudicado. É apresentado um método espectrofluorimétrico simples e sensível. A linearidade foi investigada no intervalo de concentração de 3,75 a 26,5 ppm, sendo o coeficiente de correlação entre as variáveis muito significativo, de 0,996. O limite de detecção obtido foi de 0,03 ppb devido ao efeito da  $\beta$ -ciclodextrina, e o limite de quantificação de 7,5 ppm, sendo esta a menor concentração onde foi investigada a precisão e exatidão. O método foi considerado exato e preciso na ausência da matriz, pois foi verificado na avaliação da seletividade, que há vários compostos desconhecidos presentes na matriz aquosa que provocam efeitos de filtro interno. A robustez foi avaliada por meio da aplicação de um delineamento composto central rotacional, onde foi avaliado o efeito das variáveis estudadas no método analítico. A quantificação de bisfenol A por espectroscopia de fluorescência mostrou-se um método adequado, fácil de realizar e relativamente rápido.

**Palavras-chave:** Complexos de inclusão.  $\beta$ -Ciclodextrina. Espectroscopia de fluorescência.

# DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF BISPENOL A

Caroline Zabotti

## ABSTRACT

Analytical methodologies for the quantification of bisphenol A are analytical for the quantification of bisphenol. This monitoring is by the consumer this is the environmental pollutant which has been applied in health. In the work in question, we investigated the use of a bisphenol inclusion complex as a strategy for the determination of trace levels of solutions by spectrofluorimetry. The use of the molecular encapsulation of  $\beta$ -cyclodextrin with the analyte of interest provided a high detection capacity (0.03 ppb) due to an elevation of the inclusion level, which provided higher stiffness for the bisphenol molecule response of fluorescence intensity, without interference of noise or impaired analytical signal. A simple and sensitive spectrofluorimetric method is presented. Linearity was investigated in the range of 3.85 to 26.5 ppm, the correlation coefficient being among the very significant variables, 0.996. The detection limit was 0.03 ppb for the  $\beta$ -cyclodextrin effect, and the limit of quantification was 7.5 ppm, which was a lower intensity where precision and accuracy were investigated. The method was considered accurate and accurate in the absence of the matrix, since it was verified in the sample selection, there are several unknown results present in the aqueous matrix that provoke internal filter effects. Robustness was evaluated through applications of a central rotational compound design, where the effect of the variables studied in the analytical method was analyzed. The quantification of bisphenol A by fluorescence spectroscopy proved to be a suitable method, easy to learn and fast.

**Keywords:** Inclusion complexes.  $\beta$ -Cyclodextrin. Fluorescence spectroscopy.

## 1 - INTRODUÇÃO

Com o avanço da química orgânica no século XX, o plástico começou a ser utilizado em grande escala em vários tipos de embalagens. Porém a aparência destes plásticos era um fator negativo, pois apresentava aspecto quebradiço, o que denotava fragilidade para sua aplicação. Nesse cenário, começou-se a utilizar o bisfenol A (BFA) na produção de plásticos em geral, mais particular, de policarbonatos e resinas epóxi, o que produziu maior resistência, transparência, leveza e durabilidade [1].

O policarbonato (PC) é um polímero termoplástico com alta transparência, baixo peso, resistente ao impacto e ao calor, características estas conferidas pelo BFA. Por conta disto, o PC tem sido altamente utilizado em discos compactos, garrafas de bebidas, óculos de sol, celulares, embalagem de alimentos, utensílios domésticos e na substituição de vários vidros. Além do PC, a segunda maior utilização do BFA é na manufatura da resina epóxi que tem aplicação direta no revestimento interno de latas de alimentos e bebidas (objetivando o isolamento da superfície metálica), como aditivo em filmes de policloreto de vinila (PVC) os quais são utilizados em tanques de armazenamento de água e linhas de abastecimento de água, além de ser amplamente utilizada na construção civil e revestimentos protetores para usos eletrônicos e marítimos [2,3].

Vários estudos têm confirmado a migração do BFA das embalagens de alimentos para o alimento, por meio da degradação do PC, seja por polimerização incompleta ou hidrólise parcial, que se dá pelo aquecimento ou exposição das embalagens de alimentos a soluções ácidas ou básicas. Além disto, estudos também confirmam o BFA como contaminante ambiental [4-6].

Denominado de xenoestrógeno, a polêmica a respeito do BFA se deu pelo fato de existirem vários estudos demonstrando sua atividade estrogênica. Para um composto ser denominado de xenoestrógeno o mesmo deve apresentar propriedades que perturbam o equilíbrio hormonal e conduzem a efeitos na saúde e alteração das funções reprodutivas. Estudos envolvendo ensaios *in vitro* mostram que o BFA, além de apresentar atividade estrogênica, pode apresentar atividade antiandrogênica [7]. Estudos também examinaram a correlação entre níveis elevados de BFA e impactos negativos na reprodução, desenvolvimento

neurocomportamental e alterações metabólicas, como obesidade, diabetes, tireoides, etc. [4].

A presença do BFA não se limita apenas da migração de embalagens. O BFA também está presente no meio ambiente pelo fato de ser bastante empregado nos processos industriais, e também por participar das formulações de produtos de uso doméstico. Suas principais fontes no ambiente são devido aos efluentes industriais, os esgotos domésticos, bem como os lodos provenientes das estações de tratamento de esgoto, podendo estar presente no ar, água, solo, sedimento e biota [7].

BFA é ativo em doses muito baixas, conseqüentemente, não induzem um efeito tóxico detectável, mas sim um distúrbio discreto difícil de ser detectado [8]. Sendo assim, determinar com precisão sua concentração em água, alimentos e no meio ambiente é importante para atender os níveis admitidos, visto que esta substância impacta na saúde e no meio ambiente.

Na literatura existem vários métodos analíticos para a determinação de BFA, sendo alguns exemplos a cromatografia gasosa e líquida, ambas acopladas a espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS, respectivamente), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência e ensaios biológicos após extração em fase sólida. Cada técnica analítica apresenta questões relativas aos requisitos de pré-tratamento, recuperações, tempo de análise, limites de detecção e especificidade do composto de interesse [3,9].

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é propor o desenvolvimento de um método analítico por espectroscopia de fluorescência para a quantificação de BFA, de forma a contribuir com a base de dados de metodologias analíticas já existentes para este fim. E, tendo em vista tais técnicas, a fluorescência apresenta uma vantagem pelo fato de ser uma técnica muito seletiva, pois nem todas as moléculas exibem fotoluminescência.

Neste processo, a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) será incorporada como agente promotor da fluorescência de forma a aumentar o limite de detecção da técnica para determinação dos níveis de BFA em solução aquosa.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVOS GERAIS**

Contribuir com a base de dados de metodologias já existentes para a quantificação de bisfenol A com um método espectrofluorimétrico, por meio da incorporação da  $\beta$ -ciclodextrina como agente promotor da fluorescência e a utilização da metodologia de superfície de resposta para avaliação dos efeitos das variáveis envolvidas no processo de quantificação.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar a  $\beta$ -ciclodextrina como agente ampliador do sinal de fluorescência do bisfenol A;
- ✓ Investigar as variáveis envolvidas no procedimento de quantificação por meio de estudo univariado;
- ✓ Avaliar o efeito das variáveis envolvidas no procedimento de quantificação por meio do uso da metodologia de superfície de resposta, compondo estudo multivariado;
- ✓ Validar a metodologia analítica proposta.

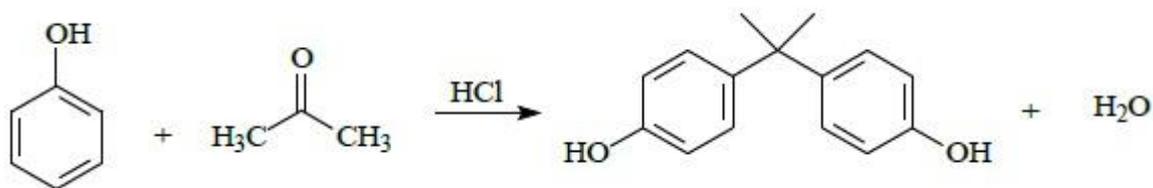
### 3 – REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 – BISFENOL A

##### 3.1.1 – Características químicas

O BFA (nome oficial na IUPAC 4,4'-(propano-2,2-diil)difenol), apresenta os sinônimos 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, 4,4'-Isopropilidenodifenol e 4,4-dihidroxi-2,2-difenilpropano e é um dos produtos químicos mais produzidos no mundo. Em condições ambientais é sólido de coloração branca, comercializado em forma de cristais ou pastilhas. Sua produção cresceu de 2,5 milhões de toneladas em 2001, para 3,9 milhões de toneladas em 2006 e 5,0 milhões de toneladas em 2010 [5,10]. Muitos países no mundo apresentam grande capacidade de produção, especialmente a Alemanha, Holanda, Estados Unidos e Japão. Seu principal mercado é a produção de PC, com a segunda maior saída em resinas epóxi. Outras utilizações incluem retardadores de chama, resinas de poliéster insaturadas e resinas de poliacrilato, polieterimida e polissulfona.

O BFA é resultado da condensação da acetona (de onde advém o sufixo A no final do nome) com dois equivalentes de fenol. A reação é catalisada por um ácido, como o ácido clorídrico ou resina poliestireno sulfonada, como mostra a FIG. 3.1. Tipicamente, um grande excesso de fenol costuma ser usado para garantir a condensação completa [1].



**Figura 3.1:** Reação de obtenção do BFA. Adaptado de [1].

Na TAB. 3.1, são apresentadas as propriedades físico-químicas da molécula de BFA.

**Tabela 3.1:** Propriedades físico-químicas do BFA [9,11,12].

| Propriedade                  | Valor                      |
|------------------------------|----------------------------|
| Peso molecular               | 228,29 g.mol <sup>-1</sup> |
| pKa                          | 9,59 – 10,30               |
| Log K <sub>ow</sub>          | 3,3 – 3,4                  |
| Log K <sub>oa</sub>          | 12,41                      |
| Log K <sub>aw</sub>          | -9,01                      |
| Ponto de fusão               | 155 °C                     |
| Ponto de ebulição            | 398 °C a 1 atm             |
| Solubilidade em água (25 °C) | 300 mg.L <sup>-1</sup>     |
| Pressão de vapor (25 °C)     | 5,23x10 <sup>-5</sup> atm  |

### 3.1.2 – Efeitos na saúde e no ambiente

O conhecimento de que o BFA pode ocasionar disfunção endócrina entre o público é bastante recente, mesmo sua atividade estrogênica ter sido relatada pela primeira vez no início dos anos de 1990 [12], onde, em estudos para determinar os estrógenos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae*, os meios condicionados por levedura mostraram a presença de uma substância que competia com [3H]-estradiol para ligação dos receptores de estrogênio a partir do útero de rato. Foi descoberto que a substância estrogênica nos meios condicionados não era um produto da levedura cultivada, e sim, produto do lixiviamento dos frascos de policarbonato durante o processo de autoclavagem, pois as leveduras haviam sido cultivadas em meio de cultura preparados a partir de água destilada autoclavada em frascos de policarbonato. A atividade de deslocamento de [3H]-estradiol foi monitorada, e a substância ativa foi purificada a partir do meio autoclavado. O produto final purificado foi identificado como BFA por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa [13].

A partir daí iniciaram-se os estudos com a finalidade de determinar se BFA contribuía significativamente para o conjunto de substâncias estrogênicas no ambiente e vários estudos de biomonitoramento conduzidos em diferentes países tem demonstrado que o BFA está presente no leite, na urina, no sangue e até mesmo em fígado de feto humano, o que demonstra a exposição ao BFA durante a gestação [12]. Os níveis destas contaminações foram estimados por vários pesquisadores, e alguns resultados encontrados foram:

Faixas de 0,65 - 0,7 ng.g<sup>-1</sup> [14], 0,28 - 0,97 ng.mL<sup>-1</sup> [15], e 1,00 a 7,00 ng.mL<sup>-1</sup> [16] no leite humano. Estas concentrações foram independentes das idades das mães, o que sugere que BFA não se acumula no corpo por muito tempo. No

plasma humano, a concentração estimada foi de  $0,59 \pm 0,21 \text{ ng.mL}^{-1}$  para os homens e de  $0,33 \pm 0,54 \text{ ng.mL}^{-1}$  para as mulheres [17]. Na urina, as algumas concentrações encontradas foram de 0,11 a  $0,51 \text{ ng.mL}^{-1}$  [18].

Em relação a dose diária tolerável sem efeito adverso a fim de entender se as concentrações encontradas anteriormente proporcionariam algum efeito, existem estudos sem consenso. Um deles exibiu relações de dose-resposta normais em toda a gama de 0,015 ppm (0,001 mg por kg de peso corporal por dia) à 75 ppm (5 mg por kg de peso corporal por dia) [19]. Porém, outro estudo demonstrou que as doses de 0,02 a 0,04 mg por kg de peso corporal por dia de BFA provocaram efeitos meióticos significativos em camundongos fêmeas [20]. Além destes, outro estudo demonstrou que a exposição a 20  $\mu\text{g}$  de BFA por dia, apenas durante a gestação, apresentou efeitos transgeracionais [21,22].

Devido a estas desarmonias, pesquisadores sugerem que é necessário determinar mais amostras para entender o nível geral de contaminação [14,23], pois estudos de exposição dietética dos camundongos ao BFA podem ter sido subestimados, pelo fato de uma única exposição oral em bolus, ou seja, administração de doses concentradas, não representar exposição de baixas concentrações a longo prazo [24].

Além dos estudos de biomonitoramento, vários estudos outros determinaram também a migração do BFA de embalagem e/ou utensílios para os alimentos [2,25,26,27], o que demonstra um grande obstáculo na estimativa da exposição humana à contabilização de todas as rotas potenciais de exposição, pois esta exposição também pode ocorrer por meio de rotas menos exploradas, incluindo contato dérmico com recibos térmicos (sem carbono), inalação de poeiras domésticas e fumaça de cigarro [28].

Infelizmente ainda há controvérsias a respeito dos estudos *in vivo* e conclusão de uma dosagem sem efeito adverso. Os efeitos sobre a saúde humana ainda são incertos [16]. Assim, revisões da extensa literatura do BFA pelo painel de especialistas e do governo, indicaram a necessidade de desenvolver dados adicionais para examinar a concentração de BFA que produz efeitos funcionais ou morfológicos [29].

É o caso da Organização Mundial de Saúde (OMS) que concluiu que a exposição ao BFA é muito inferior aos níveis que causariam preocupações, não incorrendo em problemas de saúde [30]. A agência federal do departamento de

saúde e serviços humanos dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA), também não regulamenta o BFA, alegando insuficientes evidências científicas na saúde humana nos baixos níveis de exposição. Para abordar estas questões, o Programa Nacional de Toxicologia, em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa Toxicológica (NCTR) da FDA, está realizando estudos aprofundados para responder a perguntas-chave e esclarecer incertezas sobre o BFA [31].

Para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, a dose máxima aceitável e a dose diária tolerável para BFA foram estabelecidos em 0,05 mg por kg de peso corporal por dia, enquanto o Canadá estabeleceu que a ingestão diária tolerável e provisória é de 0,025 mg por kg de peso corporal por dia. O Canadá foi o primeiro país que declarou em 2010 que o BFA é uma substância tóxica e proibiu o seu uso em mamadeiras [12].

No Brasil, a restrição do uso do BFA está descrito na Resolução RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011 da ANVISA que dispõe sobre a proibição de uso de BFA em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes, e, em seu 1º artigo determina a proibição da fabricação e importação de mamadeiras para a alimentação de lactentes que contenham a substância BFA na sua composição [32]. A proibição do uso de BFA em materiais destinados a alimentação de lactentes foi uma medida preventiva da ANVISA frente a incertezas relacionadas ao nível seguro de exposição a esta substância [33].

Para as demais aplicações, o BFA é permitido, mas a legislação brasileira estabelece limite máximo de migração específica desta substância para o alimento por meio das Resoluções 56/2012 e 17/2008 para qualquer material que se destine ao contato com alimentos. BFA é um monômero previsto na parte I da RDC 56/12 e um aditivo previsto na RDC 17/08 e a migração específica permitida que utilize o BFA tanto como monômero quanto como aditivo é  $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$  nas condições de uso da embalagem [34,35].

Em relação às legislações ambientais, não existem limites estabelecidos para o BFA em lançamento de efluentes, visto que nada consta na Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sobre o BFA [10,36].

## **3.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BFA**

A maioria dos métodos analíticos existentes na literatura para quantificação de BFA são de origem cromatográfica acoplados com detecção por massas ou por fluorescência. A técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis e a espectroscopia de fluorescência geralmente não são utilizadas para quantificação de BFA. Porém ambas são técnicas possíveis de se utilizar, sendo relativamente mais simples e baratas.

O fato do trabalho em questão realizar a quantificação de BFA por emissão ao invés da absorção, dá-se pelo fato de que o uso de uma metodologia para quantificação por emissão apresenta mais vantagens do ponto de vista analítico em relação à absorção, isto porque, a fluorescência é uma técnica muito mais seletiva, pois nem todas as moléculas fluorescem, e também, a técnica apresenta limites de detecção muito maiores em relação à absorção (a fluorescência chega ser de 10 a 100 vezes mais sensível que a absorção). Para o caso do BFA, o cromóforo da molécula é relativamente fraco e uma sensibilidade fraca é encontrada usando a detecção por absorção. Por conta disto, a espectroscopia no UV-Vis é pouco usada para quantificação de BFA, mas é possível de se utilizar, dependendo da detecção que se deseja. No caso da espectroscopia de fluorescência, o limite de detecção para o BFA é pelo menos 15 vezes mais sensível do que a espectroscopia no UV-Vis [12].

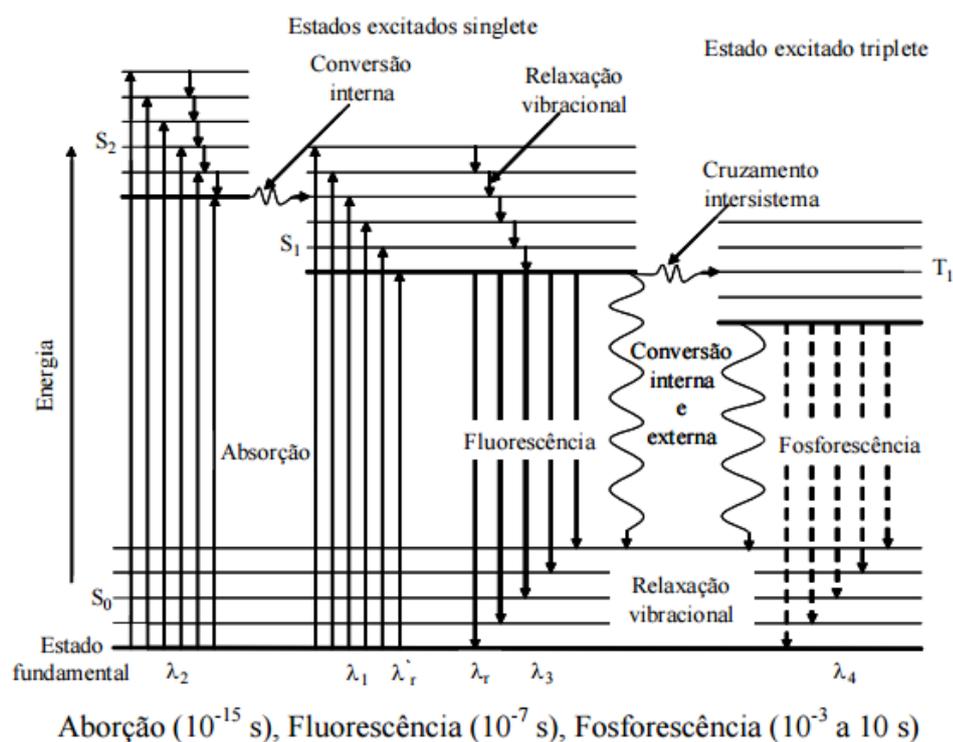
Como já mencionado, a espectroscopia de fluorescência também possibilita a realização de medidas quantitativas, possibilidade que tem sido pouco explorada. Esta técnica fundamenta-se na interação da radiação eletromagnética com a matéria e apresenta inúmeras vantagens, pois fornecem resultados rápidos de modo não destrutivo, a água não se apresenta como um interferente, possibilita a determinação em matriz sólida e sem o auxílio da quimiometria, além de se destacar pela sensibilidade, seletividade e uma ampla faixa linear de trabalho [37].

### **3.2.1 - Espectroscopia de fluorescência molecular**

A luminescência molecular é um fenômeno de emissão de radiação na região do UV-VIS por uma substância quando exposta a uma fonte de radiação (pode ser UV, Raio X e raios catódicos) pela absorção de fótons de luz. Assim, a

luminescência molecular ocorre quando o elétron de valência, anteriormente excitado por meio da absorção de energia, volta ao seu estado fundamental pela emissão de um fóton de luz, depois de ser excitado para um nível de energia mais elevado. O comprimento de onda da radiação emitida é sempre maior (menos energia) que o comprimento de onda incidente [38].

A luminescência molecular pode ser dividida em dois fenômenos: Fluorescência e fosforescência, e as diferenças entre ambas dependem da orientação do spin do elétron excitado [39,40]. Em geral, o processo de fluorescência ocorre a partir de uma transição proveniente de um estado singlete excitado para um estado singlete fundamental, enquanto que a fosforescência corresponde a uma transição de um estado triplete excitado para um estado singlete fundamental [37], como pode ser demonstrado na FIG. 3.2, pelo Diagrama de Jablonski:



**Figura 3.2:** Diagrama de Jablonski [37].

Como demonstrado no diagrama (FIG 3.2), as moléculas estão no estado vibracional de menor energia do estado eletrônico fundamental. Deste modo, a absorção do fóton de radiação irá excitar as moléculas para um estado eletrônico de energia maior, e para os diversos níveis vibracionais e rotacionais deste estado eletrônico. Com a absorção da luz, ocorre à transição do elétron do nível

fundamental ( $S_0$ , ou estado singlete fundamental) para o estado excitado ( $S_1$  e  $S_2$ , ou estados singletes excitados), e também, o elétron pode ser promovido para vários níveis vibracionais de cada estado eletrônico, por meio da relaxação vibracional (dissipação de energia na forma de calor por processos não radioativos, ocorrendo na ordem de  $10^{-11}$  s, devido ao excesso de energia presente no estado excitado) ou conversão interna (outro processo não radioativo, mais rápido, na ordem de  $10^{-12}$  s, ocorrendo quando há conversão do estado excitado  $S_2$  para o  $S_1$ ). Tais fenômenos ocorrem por meio de mecanismos de desativação para que a molécula retorne ao estado fundamental. Portanto, as moléculas dissipam energia por processos radiativos (fluorescência) quando passam do estado excitado  $S_1$  para o fundamental  $S_0$ , ou não radiativos (devido às conversões internas para estados de menor energia). Porém, para algumas moléculas, a energia envolvida na emissão do fóton, ou seja, da fluorescência, é muito mais intensa que as conversões internas. A probabilidade de decaimento do primeiro estado excitado para cada nível vibracional do estado fundamental determina a forma do espectro de fluorescência [37,38,41].

Algumas moléculas do estado excitado  $S_1$  podem sofrer transição para um estado triplete excitado por um processo não radiativo conhecido como cruzamento intersistema. Os elétrons presentes no estado excitado  $T_1$  podem retornar ao estado fundamental  $S_0$  por fosforescência ou por processos não radiativos. Em geral o fóton emitido pela transição de  $T_1$  para  $S_0$  possui menor energia do que a transição  $S_1$  para  $S_0$ , ocasionando maiores comprimentos de onda de emissão [37,41].

Da mesma forma que a absorção, um espectro de fluorescência poderá ou não ter uma progressão vibracional (que corresponde às transições do estado vibracional de menor energia do primeiro estado eletrônico excitado, para os vários estados vibracionais do estado eletrônico fundamental). Neste caso haverá uma progressão vibracional em direção a valores menores de energia (comprimentos de onda maiores). A existência de uma forte sobreposição entre os espectros de absorção e de fluorescência exige que não ocorra uma grande alteração de geometria molecular entre os dois estados envolvidos. Consequentemente, este é um dado experimental que permite avaliar alterações de geometria com o processo de excitação eletrônica. Nos casos em que esta alteração é pequena, os dois espectros se sobrepõem e se obtém espectros que são imagens especulares. Esta condição é atingida por muitos hidrocarbonetos aromáticos condensados, que são

moléculas com alguma rigidez e que, por isto, não sofrem grandes alterações de geometria com a excitação [42].

Nem todas as moléculas fluorescem. Teoricamente é difícil prever se uma molécula exibirá fotoluminescência, mas é possível observar certas características gerais na sua estrutura que favoreçam o processo de desativação radiativo eficiente. A maioria dos compostos que fluorescem são aromáticos e alguns poucos compostos alifáticos ou estruturas com ligações duplas altamente conjugadas também podem exibir fluorescência. Isto se deve ao fato dos compostos aromáticos terem níveis de transição ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) de baixa energia. Já no caso de substâncias com estruturas alifáticas, a energia necessária para promover transições  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  é tão alta que ocasiona decomposição da molécula. A rigidez na estrutura molecular restringe a liberdade vibracional, minimizando significativamente os relaxamentos vibracionais, aumentando a fluorescência [42].

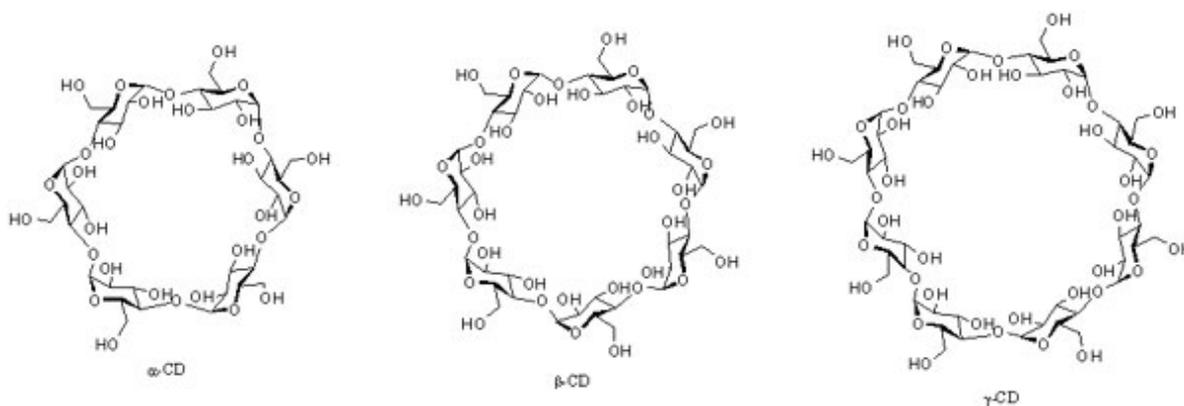
Como o BFA é uma molécula naturalmente fluorescente, a detecção por fluorescência é muito utilizada em métodos cromatográficos. Ainda, para aumentar a sensibilidade na detecção, vários trabalhos utilizaram reagentes de fluorescência com fluoróforos mais fortes para derivatizar BFA em amostras biológicas [43-45].

### 3.3 - FORMAÇÃO DE COMPLEXO DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA

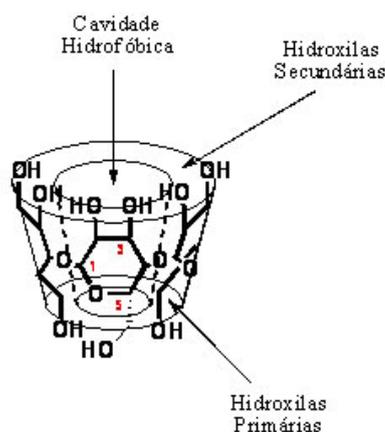
As ciclodextrinas (CDs) são carboidratos complexos, ou seja, são oligossacarídeos compostos de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e apresentam estrutura semelhante a um cone truncado. As CDs foram identificadas pela primeira vez por Franz Schardinger em 1903, como produtos resultantes da degradação do amido pela ação da enzima *glicosil transferase*, produzida pelo microorganismo *Bacillus macerans*. Esta enzima é capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento numa única molécula cíclica. Por modificação enzimática é possível obter a ciclização de seis, sete ou oito unidades de glicose, dando origem à  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ CD, respectivamente (FIG. 3.3) [46].

A estrutura cristalina das CDs foi estabelecida em 1942, por estudos de difração de raios-X, que mostrou que estas moléculas possuem hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 formando o lado mais largo, e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6 (FIG. 3.4). As hidroxilas das

extremidades tornam as CDs solúveis em água, devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o solvente. Por outro lado, o interior da cavidade, os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CDs [47].



**Figura 3.3:** Estrutura das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  – Ciclodextrina [48].



**Figura 3.4:** Esquema da estrutura funcional das CDs [48].

Por conta disto as CDs são capazes de formar complexos de inclusão (encapsulação molecular) com uma grande variedade de moléculas hóspedes (compostos orgânicos ou inorgânicos, de natureza neutra ou iônica), o que resulta numa gama de aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola. Nesses produtos, as CDs agem principalmente como veículos de solubilização em água, porque as substâncias apolares estão no interior do cone, e a interação com a água ocorre com a parte polar, que fica no exterior do tronco (Figura 5) [47,49].

Enquanto a altura da cavidade das CDs é a mesma para os três tipos, o número de unidades de glicose determina o diâmetro interno da cavidade e seu

volume. Com base nestas dimensões, a  $\alpha$ CD pode complexar com moléculas de baixo peso molecular ou compostos de cadeias laterais alifáticas. A  $\beta$ CD pode complexar com aromáticos e heterocíclicos e  $\lambda$ CD pode acomodar moléculas maiores, tais como macrociclos e esteróides [49].

As principais propriedades das CDs são dadas na TAB 3.2.

**Tabela 3.2:** Propriedades CDs [49].

| Propriedade                           | $\alpha$ CD | $\beta$ CD | $\gamma$ CD |
|---------------------------------------|-------------|------------|-------------|
| Nº de unidades de glucopiranosose     | 6           | 7          | 8           |
| Peso molecular (g.mol <sup>-1</sup> ) | 972         | 1135       | 1297        |
| Solubilidade em água a 25 °C (% m/v)  | 14,5        | 1,85       | 23,2        |
| Diâmetro externo (Å)                  | 14,6        | 15,4       | 17,5        |
| Diâmetro da cavidade (Å)              | 4,7-5,3     | 6,0-6,5    | 7,5-8,3     |
| Altura do tronco (Å)                  | 7,9         | 7,9        | 7,9         |
| Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )  | 174         | 262        | 427         |

Muitos derivados de CDs são sintetizados a partir das CDs que ocorrem naturalmente. Esses derivados geralmente são produzidos por aminações, esterificações ou esterificações de grupos hidroxila primários e secundários. Dependendo do substituinte, a solubilidade dos derivados das CDs é usualmente diferente das suas CDs precursoras. Praticamente todos os derivados alteram o volume da cavidade hidrofóbica, modificações estas que podem melhorar a solubilidade, a estabilidade (contra a luz e oxigênio), além de ajudarem a controlar a atividade química das moléculas hospedeiras [49].

Nenhuma ligação covalente quebra-se ou forma-se durante a formação do complexo de inclusão [50]. A principal força motriz da formação do complexo é a liberação de moléculas de água, ricas em entalpia, da cavidade. Moléculas de água são deslocadas por moléculas hóspedes mais hidrofóbicas presentes na solução para atingir uma associação apolar-apolar e diminuição da deformação do anel da CD, resultando em um estado de energia mais estável [51]. A ligação de moléculas hóspedes dentro da CD hospedeira não é fixa ou permanente, mas sim um equilíbrio dinâmico, e a força de ligação depende de quão bem o complexo hospedeiro-convidado se encaixa e de interações locais específicas entre os átomos da superfície [49].

Assim, a capacidade de uma CD para formar um complexo de inclusão com uma molécula hóspede é uma função de dois fatores-chave. O primeiro depende do tamanho relativo da CD em relação ao tamanho da molécula hospedeira ou de certos grupos funcionais chave dentro do hóspede. O segundo fator crítico são as interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema (CD, hóspede, solvente). Para um complexo se formar, deve haver uma força motriz líquida favorável que atraia o hóspede para a CD [49].

Em geral, existem quatro interações energeticamente favoráveis que ajudam a deslocar o equilíbrio para formar o complexo de inclusão:

- ✓ O deslocamento de moléculas de água polar da cavidade apolar da CD;
- ✓ O aumento do número de ligações de hidrogênio formadas à medida que a água deslocada retorna ao meio aquoso maior;
- ✓ Uma redução das interações repulsivas entre o ambiente hidrofóbico e o ambiente aquoso;
- ✓ Um aumento nas interações hidrofóbicas à medida que o hóspede se insere na cavidade apolar da CD.

Embora esse equilíbrio inicial para formar o complexo seja muito rápido (geralmente em poucos minutos), o equilíbrio final pode levar muito mais tempo para ser atingido. Uma vez dentro da cavidade da CD, a molécula hóspede faz ajustes conformacionais para aproveitar ao máximo as forças fracas de van der Waals que existem. Os complexos podem ser formados por uma variedade de técnicas que dependem das propriedades do material ativo, da cinética de equilíbrio, dos outros ingredientes e processos da formulação e da forma de dosagem final desejada. No entanto, cada um desses processos depende de uma pequena quantidade de água para ajudar a impulsionar a termodinâmica. Entre os métodos utilizados estão mistura seca simples, mistura em soluções e suspensões, seguida de uma separação adequada, a preparação de pastas e várias técnicas termo-mecânicas. A dissociação do complexo de inclusão é um processo relativamente rápido, geralmente impulsionado por um grande aumento no número de moléculas de água no ambiente circundante. Em sistemas altamente diluídos e dinâmicos como o corpo, o hóspede tem dificuldade em encontrar outra CD para reformar o complexo e fica livre em solução [49].

## 4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Devido à baixa concentração do composto de interesse em solução foram adotados procedimentos para reduzir interferentes originados durante o processo. Portanto, todas as vidrarias foram lavadas com álcool etílico e em seguida, enxaguadas com grande quantidade de água ultra pura, sendo as mesmas secas no ambiente.

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório GIPeFEA – Grupo interdisciplinar de Pesquisa em Fotoquímica e Eletroquímica Ambiental do Departamento de Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

### 4.1 – TESTE DE SOLUBILIDADE PARA O BFA E $\beta$ CD

Os ensaios de solubilidade foram conduzidos para o BFA (CAS 80-05-7) e a  $\beta$ CD (CAS 7585-39-9), ambos obtidos com pureza de 97,0% da Sigma-Aldrich. Apenas para a  $\beta$ CD foi determinado a concentração de saturação, ou seja, teste de limite de solubilidade, pois não haveria necessidade de determinar para o BFA já que as soluções estoques para a construção da curva analítica deveriam ser de baixa concentração para transferir para o nível ppm, diferentemente da  $\beta$ CD onde a concentração de saturação é de interesse.

Para a  $\beta$ CD as seguintes proporções foram testadas em água purificada: 11, 10, 9, 8 e 7 mg.mL<sup>-1</sup>, outro solvente para solubilização da  $\beta$ CD não foi testado tendo em vista que a água apresenta muito mais vantagem de utilização nos processos de complexo de inclusão em relação a outros solventes.

Para o BFA as proporções testadas em água purificada e álcool etílico foram: 15, 1,5, 0,15 e 0,03 g.mL<sup>-1</sup>.

## **4.2 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DA ABSORÇÃO E DA EMISSÃO**

Para a determinação do comprimento de onda do máximo de absorção do BFA, foi realizado uma varredura das soluções no espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, modelo UV-1800 e software UVProbe) numa faixa de 200 - 600 nm. Por meio do comprimento máximo de absorção determinado nesta técnica juntamente com as leituras no espectrofluorímetro (Aminco, modelo SPF500C e software 500), foi determinado o comprimento de onda de excitação.

Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos com o intervalo da amostra fixo em 1 nm, utilizando-se de cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. Os espectros de emissão na fluorescência foram obtidos com o espectrofluorímetro equipado com uma lâmpada de descarga Xenon (300 kW). A abertura das fendas de excitação e emissão foram mantidas em 4 nm. A taxa de varredura dos monocromadores foi mantida a 240 nm.min<sup>-1</sup>. A alta voltagem da fotomultiplicadora foi mantida a 950 V, e o filtro fixo em 3 para eliminação do ruído e efeitos de difração da lâmpada UV. Todas as medidas foram realizadas em uma célula de quartzo de 10 mm, com controle da temperatura através do uso de um suporte de célula termostático e um termômetro (thermometer Fuso 304, Type K).

## **4.3 – CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BFA**

BFA foi pesado em balança analítica (Mettler Toledo, modelo XP26) e diluído em álcool etílico (Scharlau, grau HPLC 99,9% CAS 64-17-5) para compor 3 soluções estoques de concentração  $6,6 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> (150 ppm). A partir destas soluções estoques, foram realizadas as diluições para balão volumétrico de 10 mL, conforme a TAB. 4.1, sendo as soluções avolumados com água ultrapura. As diluições foram realizadas por meio do uso de pipetador handystep (marca Eppendorf). A faixa toda da curva analítica permaneceu com uma concentração fixa de  $\beta$ CD de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Para garantir o encapsulamento e a total solubilização dos analitos, as soluções da curva foram expostas ao banho ultrassônico (marca Elmasonic P) por aproximadamente 15 minutos e armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas sob refrigeração a 4 °C.

As soluções da curva de analítica constituíram-se de 10 pontos equidistantes, conforme apresentados na TAB. 4.1. Esta faixa de trabalho foi determinada levando em consideração o limite de exposição sem efeito adverso [12].

**Tabela 4.1:** Construção da curva analítica de BFA.

| Pontos | Volume pipetado<br>solução estoque (mL) | BFA<br>(mol.L <sup>-1</sup> ) | BFA<br>(ppm) |
|--------|---|-------------------------------|--------------|
| 1      | 0,5                                     | $3,29 \times 10^{-5}$         | 7,50         |
| 2      | 1,0                                     | $6,57 \times 10^{-5}$         | 15,00        |
| 3      | 1,5                                     | $9,86 \times 10^{-5}$         | 22,50        |
| 4      | 2,0                                     | $1,31 \times 10^{-4}$         | 30,00        |
| 5      | 2,5                                     | $1,64 \times 10^{-4}$         | 37,50        |
| 6      | 3,0                                     | $1,97 \times 10^{-4}$         | 45,00        |
| 7      | 3,5                                     | $2,30 \times 10^{-4}$         | 52,50        |
| 8      | 4,0                                     | $2,63 \times 10^{-4}$         | 60,00        |
| 9      | 4,5                                     | $2,96 \times 10^{-4}$         | 67,50        |
| 10     | 5,0                                     | $3,29 \times 10^{-4}$         | 75,00        |

Após a realização do planejamento experimental, a faixa de trabalho da curva analítica sofreu ajuste para obtenção da linearidade.

#### 4.4 – ESTUDO UNIVARIADO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO

Visando o aumento da intensidade da fluorescência do complexo de inclusão, alguns parâmetros considerados críticos no equilíbrio do complexo de BFA e  $\beta$ CD foram avaliados individualmente, a citar a  $\beta$ CD, a temperatura, o pH e a força iônica.

A  $\beta$ CD foi incorporada ao processo, e inicialmente, uma concentração fixa em  $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> foi adicionada em todos os pontos da curva analítica para avaliação do seu efeito sob intensidade de fluorescência. A partir da verificação da resposta com o teste de limite de solubilidade, a concentração da  $\beta$ CD foi ajustada.

Foi verificado também o efeito da temperatura sob o equilíbrio e sobre a fluorescência do complexo BFA e  $\beta$ CD. A intensidade da fluorescência, para uma mesma solução da curva analítica, foi monitorada nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C.

A intensidade da fluorescência foi monitorada nos pHs de 5,0, 6,0 e 7,0. Esta faixa foi definida levando em conta as possíveis variações no pH da água. Para

manter o pH das soluções constantes, as mesmas foram tamponadas conforme procedimento de solução tampão de Sørensen ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  18 °C) [65], pelo uso de fosfato de sódio bibásico (marca Scielab, grau PA 99%, CAS 7558-79-4) e fosfato de potássio monobásico (marca Fluka, grau PA, anidro, 99-100,5%, CAS 7758-11-4). As leituras do pH foram realizadas em pHmêtro (marca Metrohm 827 pHlab).

A intensidade da fluorescência também foi monitorada considerando uma força iônica de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de uma solução de NaCl (Synth, grau PA 99,0%, CAS 7647-14-5).

#### 4.5 – ESTUDO MULTIVARIADO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO

Visando a otimização das variáveis do processo de quantificação, foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$  (8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios), no qual, foi avaliado a influência das variáveis temperatura, pH e força iônica, sendo a concentração da  $\beta\text{CD}$  mantida no seu limite de solubilidade, sobre a resposta de intensidade de fluorescência.

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR estão apresentados na TAB. 4.2. A matriz de ensaios está apresentada na TAB 4.3.

**Tabela 4.2:** Variáveis do DCCR para o estudo da intensidade da fluorescência de BFA (níveis reais e codificados).

| Variáveis / Níveis | pH  | Temperatura (°C) | Força iônica ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) |
|--------------------|-----|------------------|--------------------------------------|
| $-\alpha$ (-1,68)  | 4,3 | 16,6             | 0                                    |
| -1                 | 5,0 | 20,0             | 0,014                                |
| 0                  | 6,0 | 25,0             | 0,034                                |
| 1                  | 7,0 | 30,0             | 0,054                                |
| $+\alpha$ (-1,68)  | 7,7 | 33,4             | 0,068                                |

**Tabela 4.3:** Variáveis do DCCR 2<sup>3</sup> com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas na intensidade da fluorescência de BFA.

| Ensaio | pH <sup>a</sup> | Temp <sup>b</sup> | FI <sup>c</sup> |
|--------|-----------------|-------------------|-----------------|
| 1      | -1 (5,0)        | -1 (20,0)         | -1 (0,014)      |
| 2      | 1 (7,0)         | -1 (20,0)         | -1 (0,014)      |
| 3      | -1 (5,0)        | 1 (30,0)          | -1 (0,014)      |
| 4      | 1 (7,0)         | 1 (30,0)          | -1 (0,014)      |
| 5      | -1 (5,0)        | -1 (20,0)         | 1 (0,054)       |
| 6      | 1 (7,0)         | -1 (20,0)         | 1 (0,054)       |
| 7      | -1 (5,0)        | 1 (30,0)          | 1 (0,054)       |
| 8      | 1 (7,0)         | 1 (30,0)          | 1 (0,054)       |
| 9      | -1,68 (4,3)     | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       |
| 10     | +1,68 (7,7)     | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       |
| 11     | 0 (6,0)         | -1,68 (16,6)      | 0 (0,034)       |
| 12     | 0 (6,0)         | +1,68 (33,4)      | 0 (0,034)       |
| 13     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | -1,68 (0,000)   |
| 14     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | +1,68 (0,068)   |
| 15     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       |
| 16     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       |
| 17     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       |

<sup>a</sup>pH; <sup>b</sup>temperatura (°C); <sup>c</sup>força iônica (mol.L<sup>-1</sup>).

Para a realização deste planejamento, a concentração de BFA foi fixa em 22,5 ppm e a de  $\beta$ CD de  $6,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. A temperatura do sistema foi controlada por meio do uso de um termostato acoplado ao porta cubeta do amostrador, e por meio da circulação de um fluxo de água refrigerado e transferência de calor por condução, manteve-se a temperatura do sistema constante. O monitoramento da temperatura da solução foi realizado mantendo-se o sensor do termômetro entre a placa de condução e a cubeta.

O pH das soluções foi ajustado por meio do uso da metodologia de solução tampão de Sørensen (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18 °C) [52] e a variação na concentração de uma solução de NaCl foi utilizado para avaliação da força iônica.

Os valores das faixas de estudo do DCCR foram propostos conforme análise do estudo univariado e todos os dados foram tratados com o auxílio do software Origin versão 8.5 e actionstat versão 3.0.

#### **4.6 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA**

A validação de uma metodologia analítica deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos [53].

Para o método em questão foram avaliados os seguintes parâmetros: Seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez e estabilidade das soluções analíticas.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – TESTE DE SOLUBILIDADE

Os ensaios de solubilidade para o BFA e a  $\beta$ CD estão apresentados na TAB. 5.1, e os termos solúvel e insolúvel referem-se as concentrações testadas.

**Tabela 5.1:** Dados de solubilidade para o BFA e  $\beta$ CD.

|        | BFA       | $\beta$ CD                      |
|--------|-----------|---------------------------------|
| Água   | Insolúvel | $\leq 0,006 \text{ mol.L}^{-1}$ |
| Etanol | Solúvel   | -                               |

Apesar de alguns autores apresentarem dados de solubilidade de BFA em água:  $89 \text{ mg.L}^{-1}$  [5],  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  [12] e  $381 \text{ mg.L}^{-1}$  [54], sabe-se que o mesmo apresenta difícil dissolução em água, como indicado pelo alto valor de  $K_{ow}$  (3,3-3,4) [17,25]. Neste trabalho, verificou-se que cristais de BFA permaneciam precipitados em solução aquosa, mesmo com a utilização do banho ultrassônico. Por conta disto foi incorporado o uso do álcool etílico para diluição das soluções estoques, onde se apresentou totalmente solúvel [11]. As soluções de trabalho foram avolumadas com água, não sendo prejudicada a solubilidade. O uso de um percentual de etanol em água, ou seja, o diluente das soluções de trabalho, não proporcionou ruído nem influência nas leituras de absorvância e fluorescência, visto que o *cut-off*, ou seja, o comprimento de onda de absorção do etanol é na faixa de 205 – 210 nm, fora da faixa de absorção utilizada.

No caso do BFA, que apresenta dois fenóis em sua molécula, a solubilidade dos fenóis ocorre da mesma forma que os álcoois, formando ligações de hidrogênio com a água. Contudo, devido ao número elevado de átomos de carbono, os fenóis têm solubilidade limitada em água, mas maior do que a solubilidade de álcoois alifáticos de tamanho/massa molecular similar, devido a maior acidez dos fenóis ( $pK_a$  de aproximadamente 10) quando comparada com a acidez dos alcoóis ( $pK_a$  de aproximadamente 16). Em alguns fenóis orto-substituídos é possível ocorrer à formação de ligação de hidrogênio intramolecular. A presença desta ligação dificulta o processo de solubilização em água uma vez que reduz a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio intermolecular do tipo água-fenol [55].

Para a  $\beta$ CD verificou-se insolubilidade em álcool etílico (nas concentrações testadas), e um limite de solubilidade de  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  (com a utilização do banho ultrassônico por cerca de 20 minutos). Embora a  $\beta$ CD tenha aplicação muito frequente nas formulações comerciais disponíveis, ela apresenta uma solubilidade aquosa muito limitada (1,85% m/v a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) devido à estrutura rígida resultante da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre seus grupos hidroxílicos secundários  $\text{C}_2\text{OH}$  e  $\text{C}_3\text{OH}$  das unidades de glicose. Mesmo apresentando uma solubilidade limitada, sua aplicação na indústria não é limitada visto que modificações químicas em sua estrutura são realizadas, como a HP $\beta$ CD, que é a  $\beta$ CD modificada, alterando suas propriedades físico-químicas, possibilitando ainda mais sua aplicação em nível industrial [45,56-58].

A incorporação da água como solvente apresenta vantagens quando se trabalha com as CDs, pois à medida que a quantidade de água é aumentada, favorece a solubilização da CD e do hóspede, de modo que a complexação ocorre mais prontamente. No entanto, esta medida deve ser ajustada, pois soluções muito diluídas dificultam a formação do complexo em relação à solução mais concentrada. Portanto, é desejável que a quantidade de água garanta que a complexação ocorra a uma taxa rápida [49].

A água é o solvente mais comumente utilizado nas reações de complexação. Quanto mais solúvel a CD no solvente, mais moléculas ficam disponíveis para a complexação. O convidado deve deslocar o solvente da cavidade da CD se o solvente se alojar no interior da cavidade. A água, por exemplo, é facilmente deslocada, formando complexos livres de solvente. No caso de hóspedes com vários componentes, um dos componentes pode interagir como solvente e ser incluído como convidado. Nem todos os hóspedes são facilmente solubilizados em água, tornando a complexação muito lenta ou impossível. Em tais casos, o uso de um solvente orgânico para dissolver o hóspede é desejável, por isso a incorporação do etanol nas soluções mãe de BFA. Este solvente não deve complexar bem com a CD e ser facilmente removido por evaporação. Etanol e éter dietílico são bons exemplos de tais solventes [49].

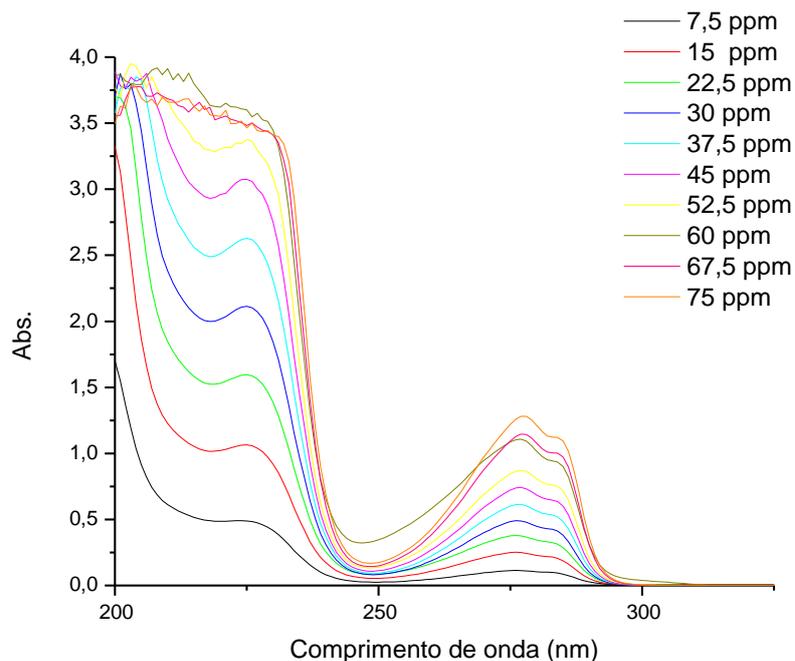
A solubilidade das CDs na água é incomum, uma vez que uma tendência irregular é observada na série dos oligômeros cíclicos da glicose. A  $\beta$ CD é 9 a 11 vezes menos solúvel em água em comparação com  $\alpha$  e  $\gamma$ CD, respectivamente. Este comportamento intrigante tem sido discutido em termos do efeito causado pelas CDs

na estrutura da rede de água, e pesquisas revelam que a  $\beta$ CD induz ordenação mais forte na água em comparação com as demais. A entalpia das soluções das três CDs é muito similar, mas a entropia de solução da  $\beta$ CD é menor em relação as demais, portanto, a menor solubilidade na água é conduzida pela entropia menos favorável [59].

Na forma cristalina, apenas as moléculas de superfície do cristal de  $\beta$ CD estão disponíveis para complexação. Em solução, mais moléculas de  $\beta$ CD ficam disponíveis. O aquecimento aumenta a solubilidade da  $\beta$ CD, assim como a do hóspede, e isso aumenta a probabilidade de formação de complexos [49].

## **5.2 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO ESPECTROFOTÔMETRO E DO ESPCTROFLUORÍMETRO**

Após avaliação da solubilidade dos analitos, foi determinado o comprimento de onda de absorção do BFA, por meio de uma varredura das soluções de trabalho no espectrofotômetro para determinação do comprimento de onda máximo de absorção, do qual foi utilizado mais tarde como comprimento de onda de excitação no espectrofluorímetro. Uma varredura de 200 a 600 nm foi realizada, com cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e intervalo de aquisição fixo em 1 nm. A FIG. 5.1 apresenta a sobreposição dos espectros na região do UV-Vis para as soluções de trabalho de BFA.

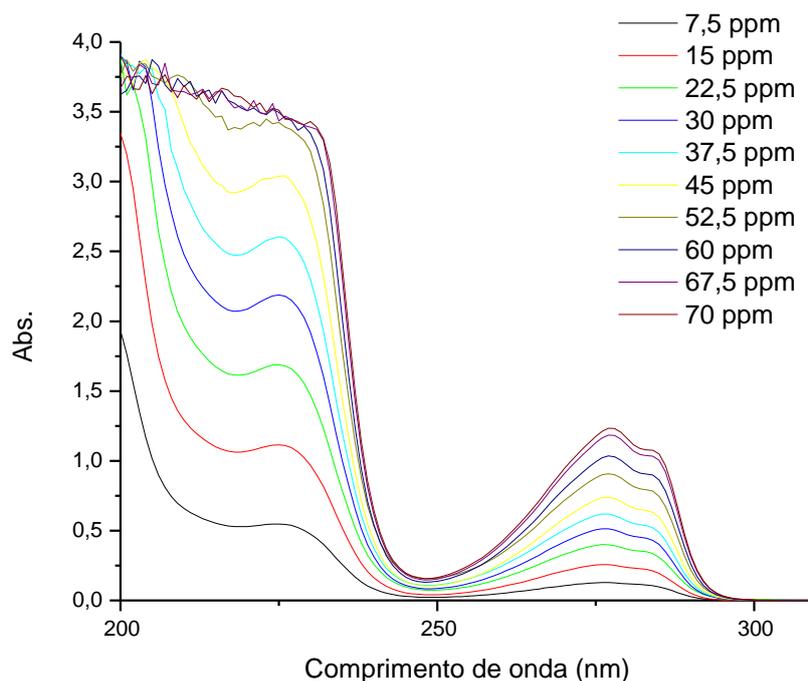


**Figura 5.1:** Sobreposição dos espectros na região do UV-VIS das soluções de trabalho de BFA.

O BFA apresenta dois comprimentos de absorção máximos ( $\lambda_{\text{máx}}$ ): 225 e 277 nm. Valores semelhantes foram observados por outros autores [5,12,23,50,60,61].

Para esta mesma curva analítica, foi adicionada a  $\beta$ CD de forma que a concentração final de  $\beta$ CD em todas as soluções de trabalho fosse de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. A utilização desta baixa concentração neste primeiro momento foi devida a sua baixa solubilidade em água, e para verificar se, em pequenas concentrações, já promoveria o aumento da intensidade da fluorescência, e ainda, verificar a linearidade da curva analítica. Esta concentração foi determinada a fim de que a relação entre o complexante e o analito fosse equimolar.

A FIG. 5.2 apresenta a sobreposição dos espectros na região do UV-Vis para as soluções de trabalho de BFA com  $\beta$ CD.



**Figura 5.2:** Sobreposição dos espectros na região do UV-Vis das soluções de trabalho de BFA com  $\beta$ CD.

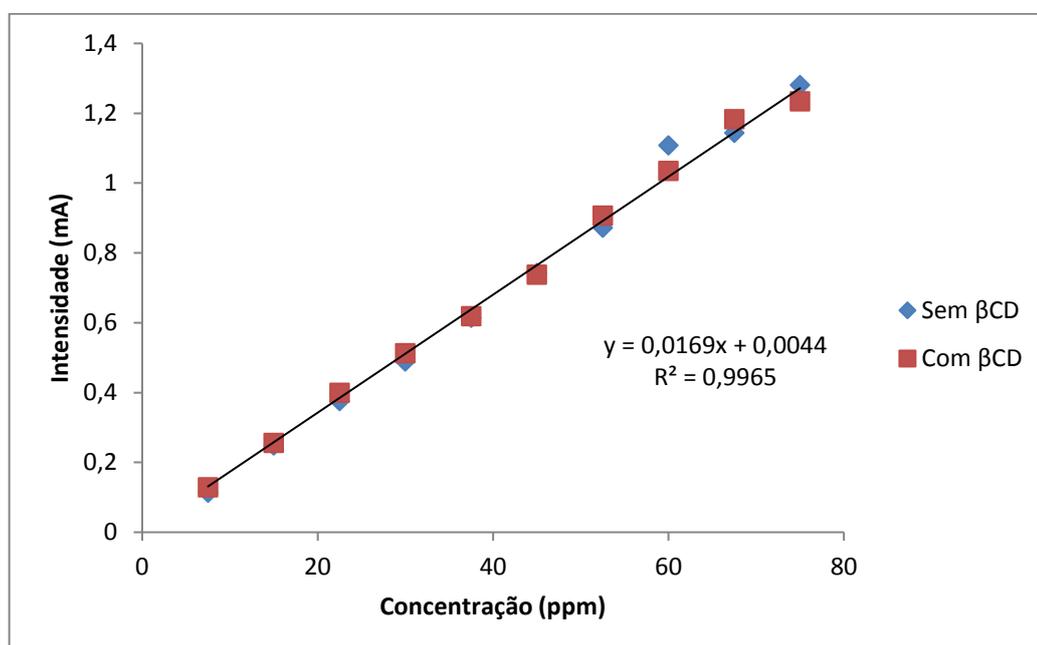
Os dois  $\lambda_{\text{máx.}}$  277 e 225 nm mantiveram-se, ou seja, a formação do complexo de inclusão com a  $\beta$ CD não provocou alterações nos espectros absorção do BFA.

Após a determinação do comprimento de onda de absorção, foi levantado uma curva padrão no espectrofotômetro, para avaliar a relação entre a concentração (ppm) *versus* a resposta analítica (absorção) na ausência e presença da  $\beta$ CD nas soluções de trabalho.

Como pode ser visto na FIG. 5.3, a relação obtida entre as variáveis foi linear crescente, sendo R (coeficiente de Pearson) de 0,997. Assim, a resposta analítica apresentou-se diretamente proporcional à concentração do analito complexado e não complexado.

Na mesma Figura constatou-se que a oitava leitura (concentração de 60 ppm), apresentou absorção maior, fora da tendência da curva padrão. Isto pode ser constatado também no espectro de absorção da FIG. 5.1, onde a mesma leitura apresentou um espectro distorcido em relação aos demais, indicando que, provavelmente, alguma contaminação ocorreu (podendo ser esta contaminação

referente ao preparo da amostra, como lavagem das vidrarias, ou a limpeza da cubeta, ou até mesmo, algum erro de pipetagem).



**Figura 5.3:** Relação entre as variáveis concentração de BFA, BFA+βCD versus Absorbância.

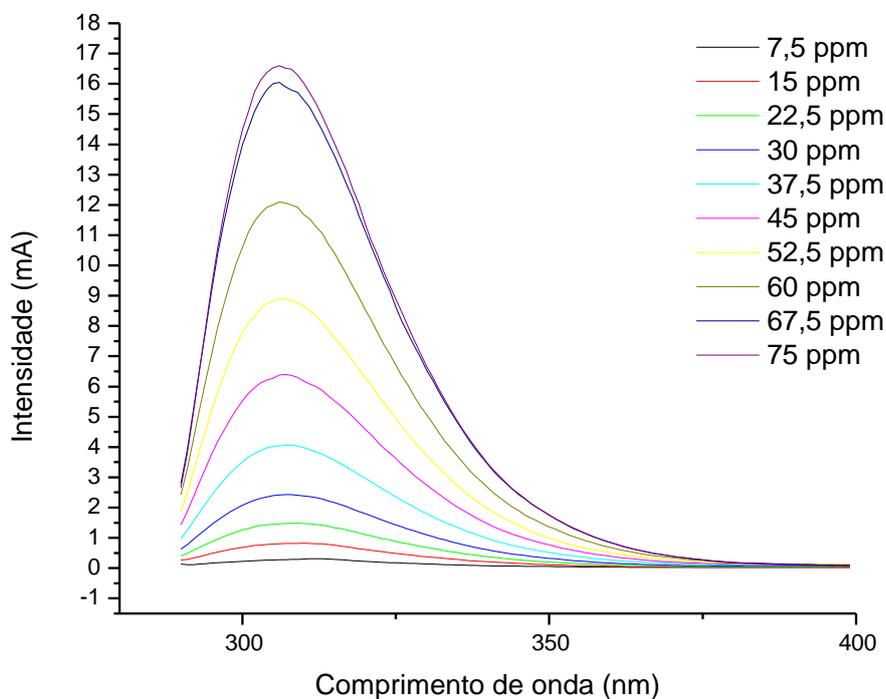
Assim, confirmou-se que a formação do complexo de inclusão de βCD com o BFA não promoveu alterações na absorção e nem na relação linear entre a concentração do analito e a resposta analítica.

Como o objetivo do trabalho não é realizar a quantificação por absorção e sim por emissão, esta reta foi obtida para fins de comparação entre a absorção e a emissão, por isto, não foram realizadas maiores réplicas e também análises estatísticas para regressão.

Após a verificação dos máximos de absorção, foi realizado uma varredura das mesmas soluções no espectrofluorímetro numa faixa de 200 - 800 nm, e então, determinado o comprimento onda de excitação. Para a realização destas leituras, a abertura fenda para excitação e emissão foi fixo em 4 nm. A alta voltagem da fotomultiplicadora foi mantida em 950 V, e o filtro para eliminação do ruído da linha de base e efeitos de difração da lâmpada UV foi fixo em 3.

A partir dos ensaios no espectrofotômetro e no espectrofluorímetro, verificou-se que 282 nm foi o melhor comprimento de onda de excitação. A emissão foi investigada numa faixa 290 a 400 nm com os mesmos parâmetros de equipamento citados anteriormente.

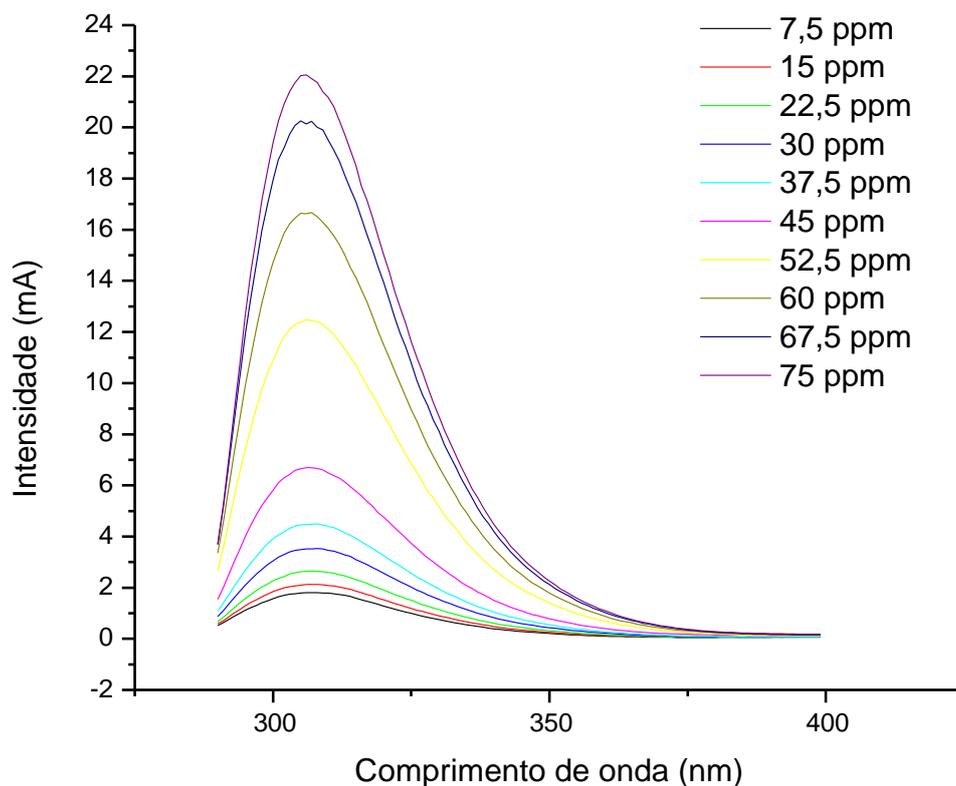
A FIG. 5.4 apresenta a sobreposição dos espectros de fluorescência para as soluções de trabalho de BFA.



**Figura 5.4:** Sobreposição dos espectros de fluorescência das soluções de trabalho de BFA.

O  $\lambda_{\text{máx}}$  de emissão foi de 306 nm. O comprimento de onda de emissão utilizado para BFA encontrado na literatura é mais consistente em relação ao comprimento de onda de absorção, variando de 300 para 317 nm [5,12,23,60,61].

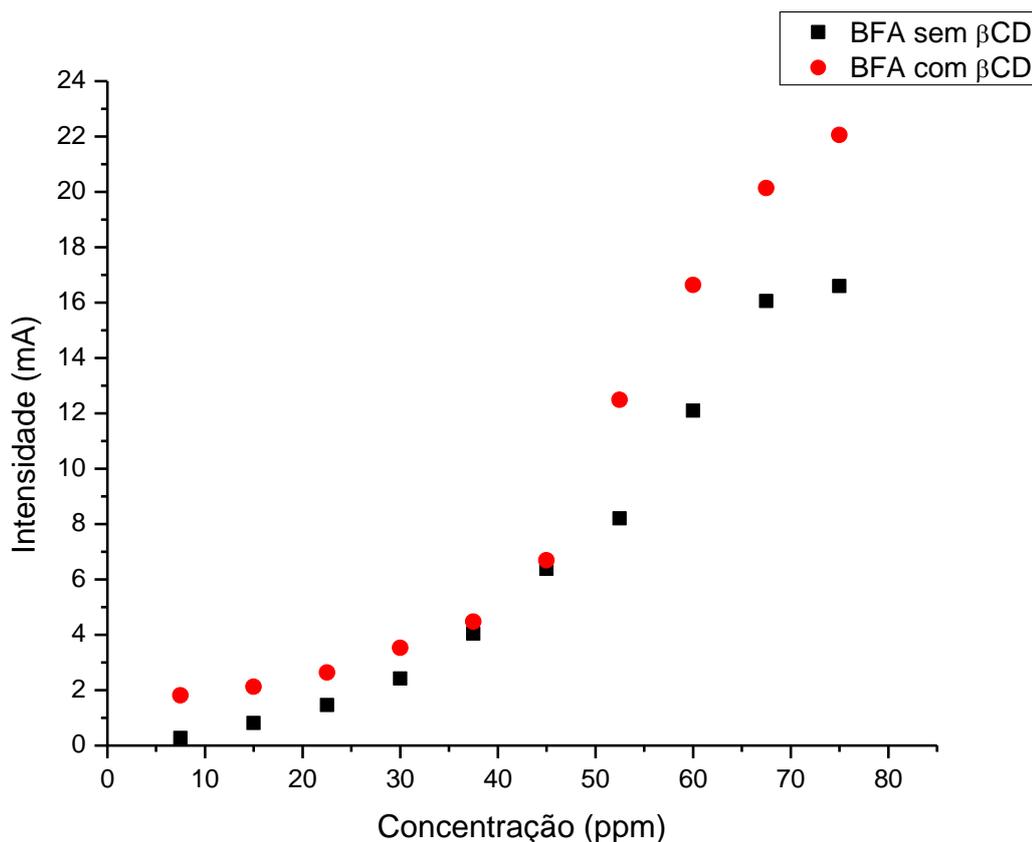
Como realizado anteriormente para a avaliação da absorção foi realizado também para a avaliação da emissão, em que as mesmas soluções de trabalho com a adição da  $\beta$ CD de concentração final de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  foram avaliadas no espectrofluorímetro. A FIG. 5.5 apresenta a sobreposição dos espectros de emissão para as soluções de trabalho de BFA com a  $\beta$ CD.



**Figura 5.5:** Sobreposição dos espectros de fluorescência das soluções de trabalho de BFA com  $\beta$ CD.

Pode-se verificar que houve modificações na intensidade da emissão, ou seja, aumento na resposta quando a  $\beta$ CD foi incorporada às soluções de trabalho. Como visto na FIG. 5.2, a incorporação da  $\beta$ CD não promoveu nenhuma alteração nos espectros de absorção, indicando que a intensidade da emissão foi alterada pela confirmação do encapsulamento molecular da  $\beta$ CD com o BFA, e confirmando também, que houve maior rigidez para a molécula de BFA, fazendo com que ocorresse a diminuição da perda de energia do estado excitado por relaxamento vibracional e aumento da perda de energia da molécula de BFA por emissão de fóton.

Após a obtenção dos espectros de emissão, foi levantado uma curva analítica com e sem a presença da  $\beta$ CD para avaliação da relação entre a concentração (ppm) *versus* a resposta analítica (intensidade de fluorescência), apresentados na FIG. 5.6.



**Figura 5.6:** Relação da intensidade de fluorescência para BFA com e sem  $\beta$ CD.

Verificou-se que houve muitas flutuações em ambas as curvas e comportamento não linear. Por conta de tais flutuações, estes testes foram repetidos, porém apenas para as soluções de BFA com a  $\beta$ CD na curva analítica, visto o objetivo do trabalho, que é a incorporação deste complexante, e, também pelo fato dos dados de absorção que não apresentaram variações, indicando que os desvios não estavam na formação do complexo de inclusão.

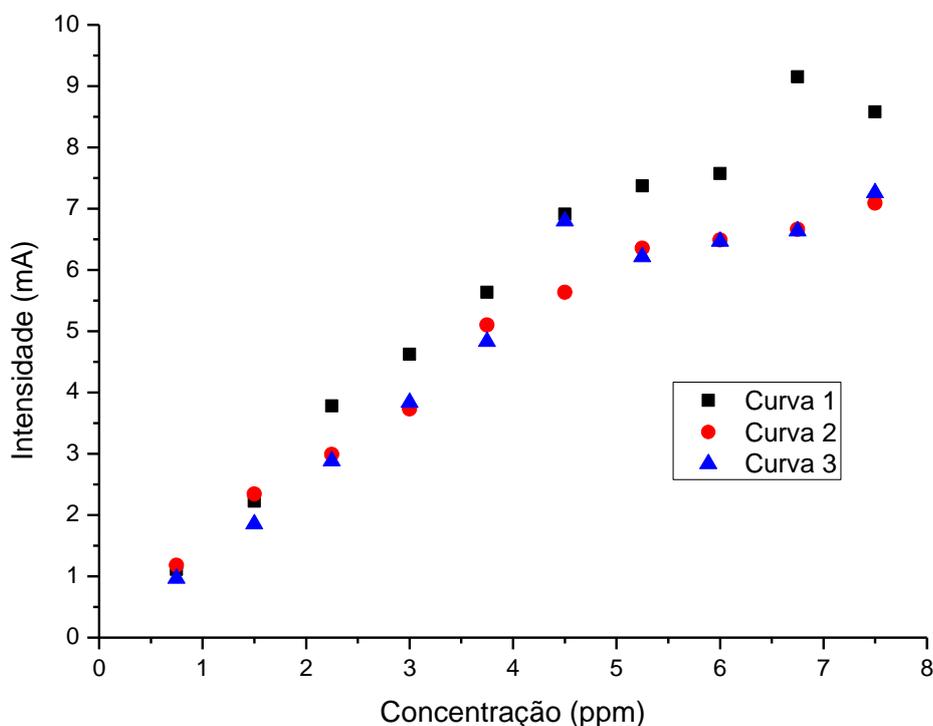
Neste novo ensaio, a faixa de trabalho foi diminuída em 10 vezes a fim de descartar possíveis efeitos de concentração, ou seja, a perda da linearidade ser devido às altas concentrações, caracterizado pelo efeito de filtro interno.

Portanto, a nova curva analítica foi verificada na faixa de 0,75 a 7,5 ppm, constituindo-se de 10 pontos equidistantes. As diluições foram realizadas conforme o procedimento descrito na TAB. 5.2. As diluições descritas nesta tabela foram realizadas a partir de 3 soluções mães a 15 ppm. Os ensaios estão dispostos na FIG. 5.7.

**Tabela 5.2:** Construção da curva analítica de BFA.

| Pontos | Vol. pipetado (mL)* | BFA (mol.L <sup>-1</sup> ) | BFA (ppm) |
|--------|---------------------|----------------------------|-----------|
| 1      | 0,5                 | $3,29 \times 10^{-6}$      | 0,75      |
| 2      | 1,0                 | $6,57 \times 10^{-6}$      | 1,50      |
| 3      | 1,5                 | $9,86 \times 10^{-6}$      | 2,25      |
| 4      | 2,0                 | $1,31 \times 10^{-5}$      | 3,00      |
| 5      | 2,5                 | $1,64 \times 10^{-5}$      | 3,75      |
| 6      | 3,0                 | $1,97 \times 10^{-5}$      | 4,50      |
| 7      | 3,5                 | $2,30 \times 10^{-5}$      | 5,25      |
| 8      | 4,0                 | $2,63 \times 10^{-5}$      | 6,00      |
| 9      | 4,5                 | $2,96 \times 10^{-5}$      | 6,75      |
| 10     | 5,0                 | $3,29 \times 10^{-5}$      | 7,50      |

\*Volume pipetado da solução mãe a 15 ppm para balão volumétrico de 10 mL.



**Figura 5.7:** Relação da intensidade de fluorescência de BFA +  $\beta$ CD.

Como verificado anteriormente, as flutuações continuaram a ocorrer. Tendo já descartado a hipótese de que os desvios eram provenientes da formação do complexo de inclusão e agora descartado a hipótese de que os desvios fossem provenientes dos efeitos de concentração (curva 10 vezes mais diluída), foi investigado o efeito das variáveis externas.

Para avaliar o efeito das variáveis externas foi realizado um estudo univariado. As variáveis monitoradas foram o pH, a temperatura, a concentração de  $\beta$ CD e a força iônica das soluções, e seus efeitos na fluorescência foram investigados individualmente.

### **5.3 – ESTUDO UNIVARIADO – INVESTIGAÇÃO DAS FLUTUAÇÕES NA CURVA ANALÍTICA**

Um estudo univariado das variáveis consideradas críticas no processo foi realizado devido às flutuações obtidas no levantamento da curva padrão no espectrofluorímetro. Na caracterização por UV-Vis não foi verificado desvios da linearidade ou flutuações, e ainda, as alterações realizadas na concentração do analito na curva padrão, não diminuiu ou extinguiu as variações, indicando que, possivelmente, os desvios eram provenientes de variáveis externas.

Por conta disto, as variáveis temperatura,  $\beta$ CD, pH e força iônica, foram investigadas frente a resposta intensidade de fluorescência do complexo BFA e  $\beta$ CD.

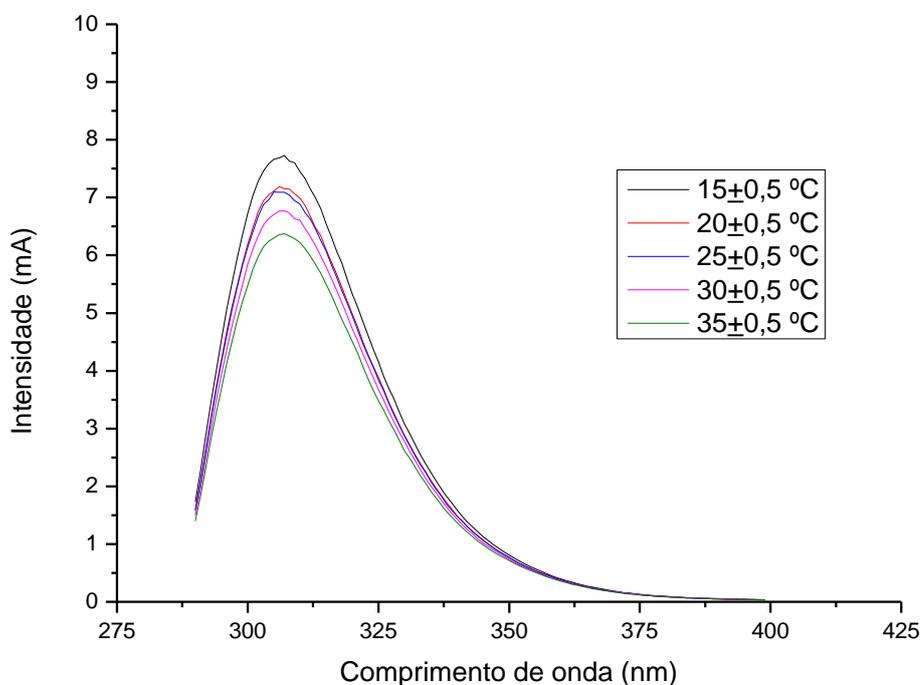
Estas variáveis podem apresentar um profundo efeito nas características luminescentes de uma substância, afetando não somente a velocidades dos processos luminescentes e dos processos não radiativos, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia.

#### **5.3.1 - Avaliação da temperatura**

O efeito da temperatura na intensidade da fluorescência do complexo de BFA e  $\beta$ CD foi monitorado numa faixa de 15 a 35  $\pm$  0,5 °C, como apresentado na FIG. 5.8 (a) e (b). As demais variáveis foram fixas em: pH em 6,0, força iônica em 0 mol.L<sup>-1</sup>, BFA em 7,5 ppm e  $\beta$ CD 0,006 mol.L<sup>-1</sup>

Para manter a temperatura das soluções constante, um termostato foi acoplado ao porta cubeta do espectrofluorímetro e, por meio da circulação de um fluxo de água refrigerado ou aquecido, e, por transferência de calor por condução, manteve-se a temperatura do sistema constante.

O monitoramento da temperatura da solução na cubeta foi realizado mantendo-se o sensor do termômetro entre a placa de condução e a cubeta, e as leituras só foram realizadas quando houve estabilização da temperatura.



**Figura 5.8:** Espectros de emissão do complexo de BFA +  $\beta$ CD (7,5 ppm) em função da temperatura.

A temperatura apresentou efeito na intensidade da fluorescência do complexo. Quanto maior foi a temperatura, menor foi a resposta obtida. Em geral, o aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional na desativação do estado excitado, ou seja, a eficiência quântica da maioria das espécies fluorescentes diminui com a elevação da temperatura, pois com o aumento da mesma ocorre diminuição da viscosidade, maior frequência das colisões, favorecendo a desativação por conversão externa [63].

Além disto, a temperatura também apresenta efeitos sobre os complexos com a  $\beta$ CD. O aquecimento pode aumentar a solubilidade do complexo, mas, ao mesmo tempo, também desestabiliza o complexo. Esses efeitos geralmente precisam ser balanceados. Como a estabilidade térmica do complexo varia de convidado para convidado, a maioria dos complexos começam a se decompor a uma faixa de temperatura entre 50 e 60 °C, enquanto alguns complexos são estáveis

a temperaturas mais altas, especialmente se o convidado está fortemente ligado ou o complexo é altamente insolúvel [49].

Na literatura foi possível verificar a dependência da intensidade de fluorescência de BFA e  $\beta$ CD (razão equimolar) na temperatura. A fluorescência foi investigada no intervalo de 10 a 70 °C e o sinal de emissão diminuiu para todos os analitos quando a temperatura do sistema foi aumentada, sendo o efeito totalmente reversível [60].

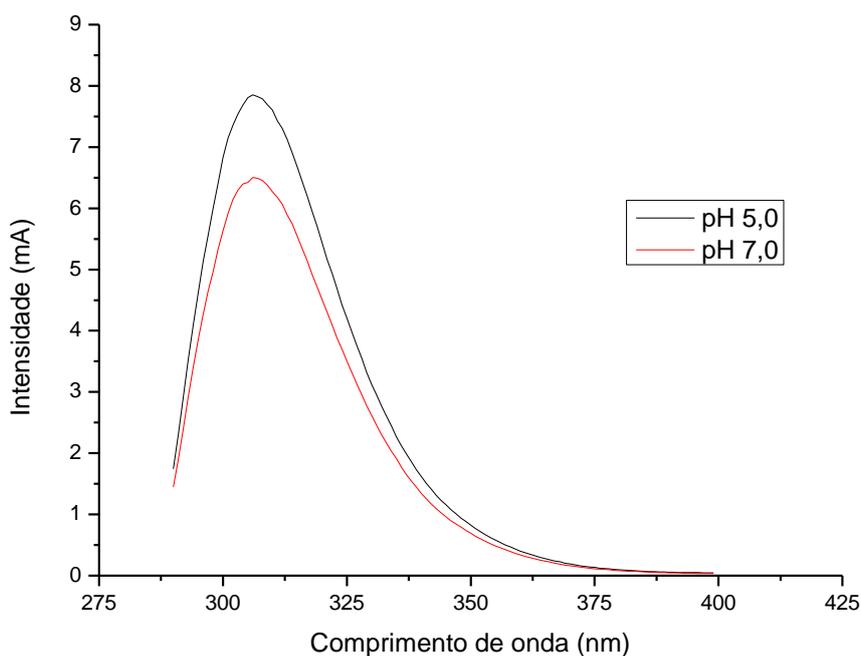
Temperaturas menores que 15 °C não foram possíveis de se avaliar no trabalho em questão pelo fato de que a temperatura de 15 °C promoveu a condensação de água na parte externa da cubeta, o que fez com que ocorresse a diminuição da intensidade do sinal pelo fato de haver espalhamento da luz incidente.

### **5.3.2 - Avaliação do efeito do pH**

O efeito do pH na intensidade da fluorescência do complexo BFA e  $\beta$ CD foi verificado nos pHs 5,0 e 7,0. Estes pHs foram selecionados tendo em vista as variações que possam ocorrer naturalmente no pH da água, e tendo em vista também o diluente do método em questão.

As variáveis fixas foram: Temperatura em  $25 \pm 0,5$  °C, força iônica em 0 mol.L<sup>-1</sup>, BFA em 7,5 ppm e  $\beta$ CD 0,006 mol.L<sup>-1</sup>

A FIG. 5.9 (a) e (b) apresenta os espectros de emissão do complexo de BFA e  $\beta$ CD nos pHs 5,0 e 7,0.

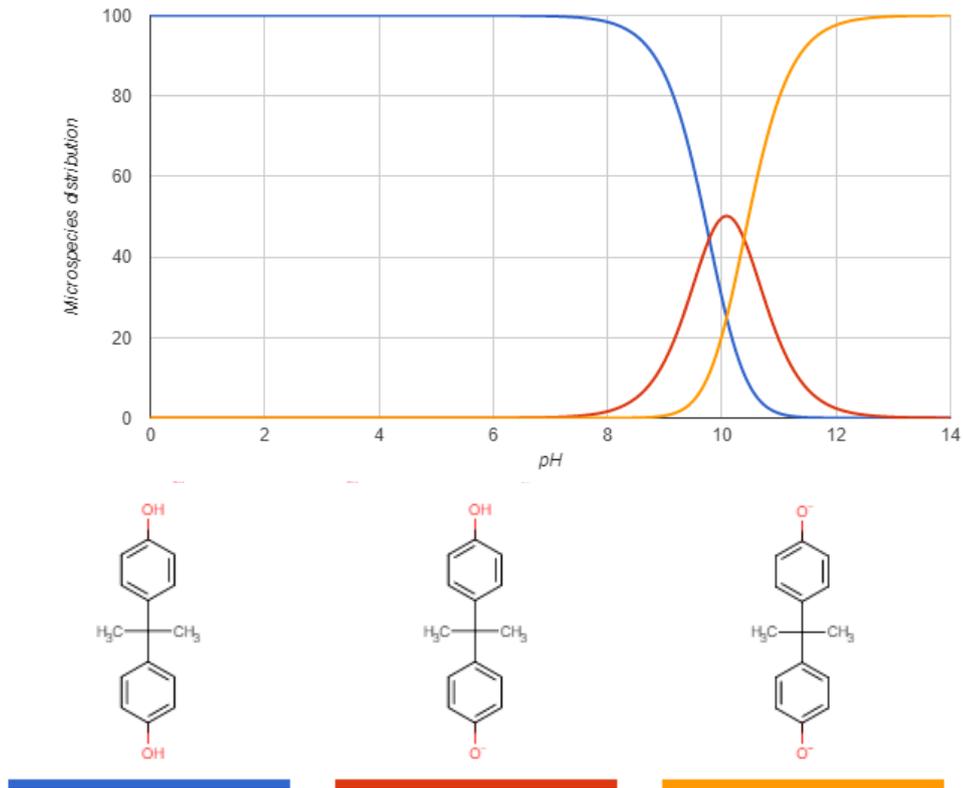


**Figura 5.9:** Espectros de emissão do complexo de BFA +  $\beta$ CD (7,5 ppm) em função do pH.

Com o aumento do pH, ou seja, com a desprotonação do complexo, houve perda na intensidade da resposta. Em pH ácido, a intensidade do complexo apresentou-se 17,2% maior.

A fluorescência de compostos aromáticos com funcionalidades ácidas ou básicas apresenta forte dependência com o pH. Neste sentido, variações na composição da água, podem alterar o pH das soluções e conseqüentemente no sinal da fluorescência.

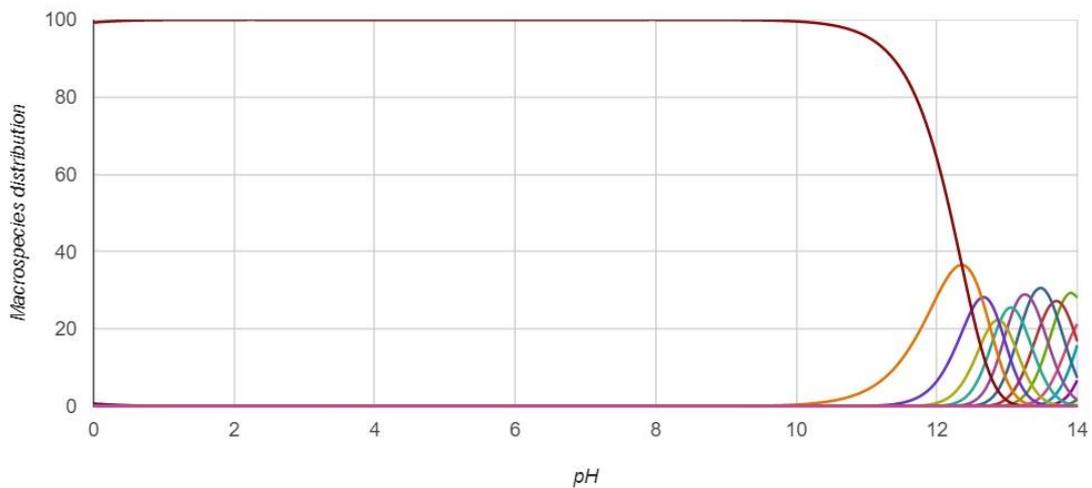
A distribuição das espécies de BFA com a mudança do pH, pode ser observado na FIG. 5.10.

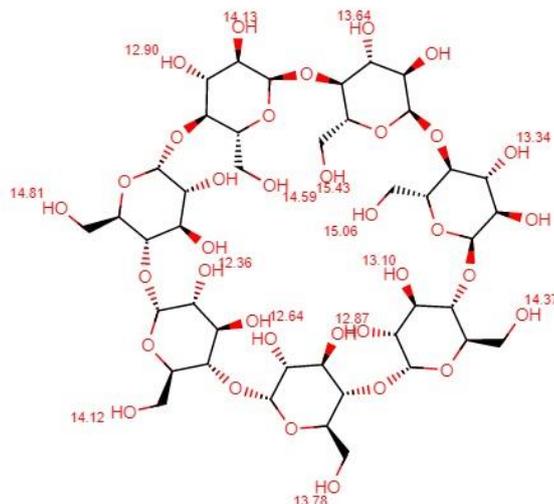


**Figura 5.10:** Distribuição das espécies de BFA em função do pH [64].

Por meio da FIG. 5.10, verifica-se que BFA apresenta dois pKas: 9,78 e 10,39, e sendo um composto fenólico, é um ácido fraco que se dissocia com alto valor de pH.

A distribuição das espécies da  $\beta$ CD com a mudança do pH, pode ser observado na FIG. 5.11.





**Figura 5.11:** Distribuição das espécies de  $\beta$ CD em função do pH [64].

Por meio da FIG. 5.11, verifica-se que  $\beta$ CD apresenta vários pKas, sendo a partir de 12,36 a ocorrência da primeira dissociação.

A literatura traz que o pH ideal para detecção de fluorescência do BFA é na faixa de 5,8 a 9,5, pois sendo o pKa do BFA de aproximadamente 9,78, a dissociação é inibida a pHs menores que 9,78 e as intensidades de fluorescência do BFA permaneceram constantes abaixo deste pH [60]. Porém, para o complexo do BFA com a  $\beta$ CD, as variações de pH podem não só interferir no sinal da fluorescência, mas também, favorecer ou não o encapsulamento molecular, e conseqüentemente, alterações no sinal.

Por conta disto, faz-se necessário otimizar o pH para favorecer o equilíbrio do complexo e obter maior intensidade da resposta. Esta faixa de pH deve ser otimizada entre a faixa neutra à ácida, pois trabalhar-se com valores de pH acima do pKa do BFA, trabalha-se em um pH onde a molécula de BFA fica desprotonada e, conseqüentemente, com caráter polar. A molécula com caráter polar é hidratada e não interage mais com a cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD, e sim com a água, fazendo com que ocorra a diminuição da intensidade da fluorescência. Além disto, espécies com cargas tem maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de que espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular [40].

Em um estudo realizado sobre a avaliação do complexo de BFA+ $\beta$ CD sobre a fluorescência, a dependência da intensidade de fluorescência no pH foi estudada na faixa de 3,0 a 13,0, com a temperatura fixa em  $20 \pm 0,5$  °C. Neste

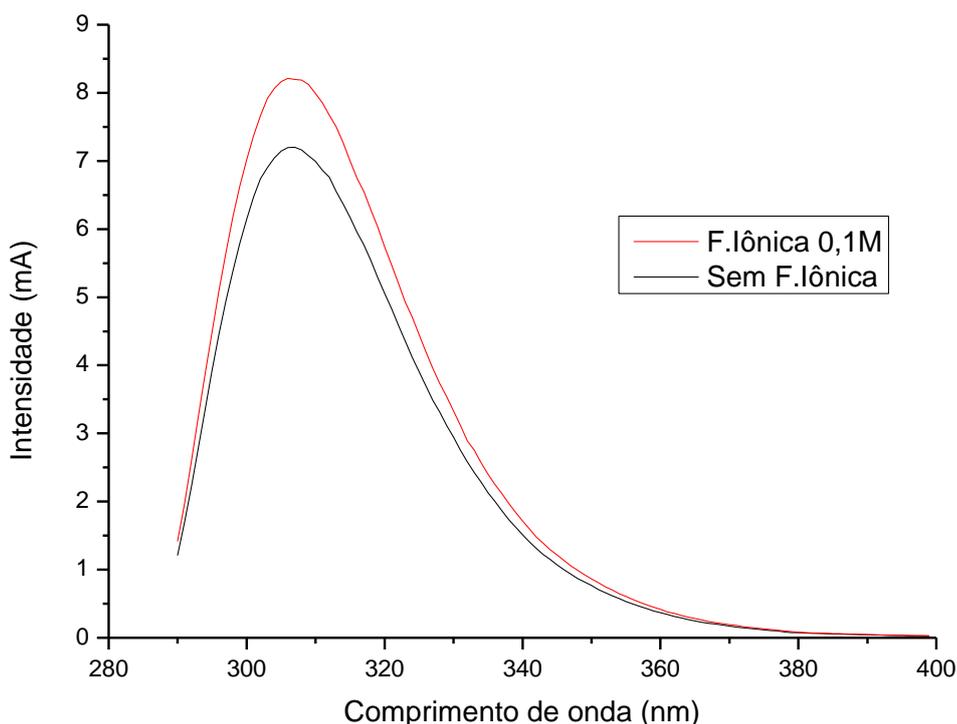
estudo, constatou-se que, embora a molécula tenha dois grupos fenólicos, apenas a forma ácida mostrou fluorescência e o sinal permaneceu constante em relação ao pH do meio até o pH de dissociação [60].

Além do efeito do pH há de considerar o efeito do pH no solvente. O efeito do pH nos sistemas de solventes próticos (no caso da água e do etanol) também é relevante na fluorescência de moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos [41,65].

### 5.3.3 - Avaliação da força iônica

A FIG. 5.12 apresenta o efeito da força iônica de uma solução a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl do complexo BFA e  $\beta$ CD sobre a fluorescência.

As variáveis fixas foram: Temperatura em  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH em 6,0, BFA em 7,5 ppm e  $\beta$ CD  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$ .



**Figura 5.12:** Espectros de emissão do complexo de BFA +  $\beta$ CD (7,5 ppm) em função da força iônica.

O uso de uma solução de NaCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  para avaliação das espécies sobre a fluorescência, foi para verificar às variações que possam ocorrer na resposta

quando a água apresenta íons em solução, tendo em vista que o diluente do método é a água. A presença destes íons proporcionou efeito positivo na resposta, no qual, promoveu um pequeno aumento na intensidade, de 7,199 para 8,197 mA. Tendo em vista estes resultados, ressalta-se a importância do uso da água ultrapura para aplicação desta técnica.

#### 5.3.4 - Avaliação da $\beta$ CD

Considerando o equilíbrio a seguir disposto na equação 1, sendo  $\beta$ Fa o BFA complexado com a  $\beta$ CD:



A equação da constante de equilíbrio é dada pela equação 2:

$$k = \frac{[\beta\text{FA}]}{[\beta\text{CD}][\text{BFA}]} \quad (\text{Equação 2})$$

É sabido que a constante de equilíbrio do complexo da  $\beta$ CD é de  $10^4$  mol.L<sup>-1</sup>. Substituindo então na equação 2 temos que:

$$10^4 \cdot [\beta\text{CD}] = \frac{[\beta\text{FA}]}{[\text{BFA}]} \quad (\text{Equação 3})$$

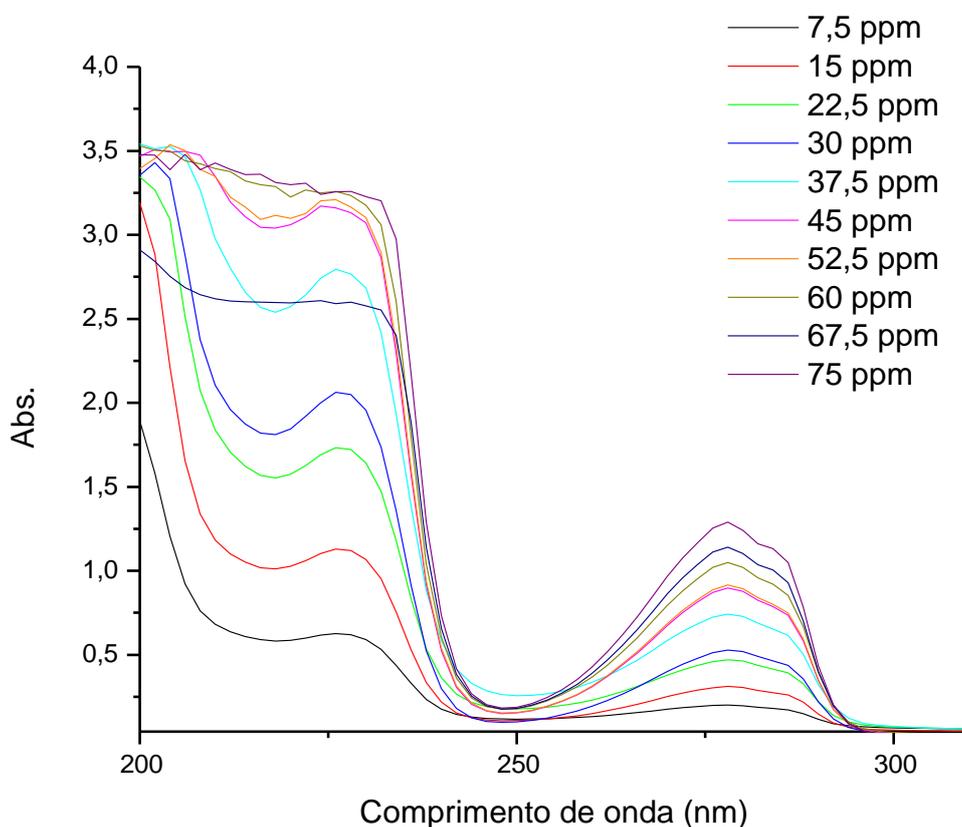
Considerando que, para haver a complexação de todo BFA, ou seja, que todo BFA esteja complexado com a  $\beta$ CD, é necessário que a concentração da  $\beta$ CD esteja pelo menos 10 vezes maior que a concentração de BFA livre. Faz-se assim necessário utilizar uma concentração de pelo menos  $1,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ CD, conforme substituição na equação 3:

$$[\beta\text{CD}]_{10} = \frac{10}{10^4} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \quad (\text{Equação 4})$$

Após a determinação da concentração necessária de  $\beta$ CD para complexar todo BFA da curva analítica, foi incorporado a  $\beta$ CD nas soluções de trabalho de forma que a concentração final de  $\beta$ CD de todas as soluções fosse de  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$ , ou seja, foi utilizado o limite de solubilidade do oligossacarídeo, concentração está acima da concentração mínima que garante, portanto, a complexação de todo BFA.

Após isto, foi realizado uma varredura das soluções de trabalho no espectrofotômetro para verificar se o comprimento de onda de absorção máximo se manteria em relação as soluções de trabalho sem  $\beta$ CD, como visto anteriormente.

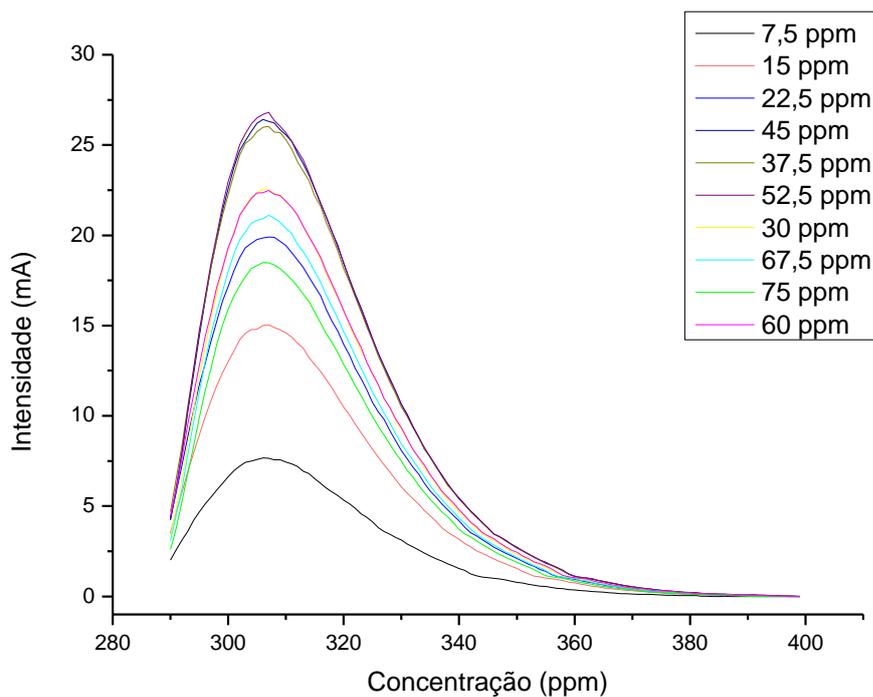
Os dados obtidos para absorção neste novo experimento estão apresentados na FIG. 5.13.



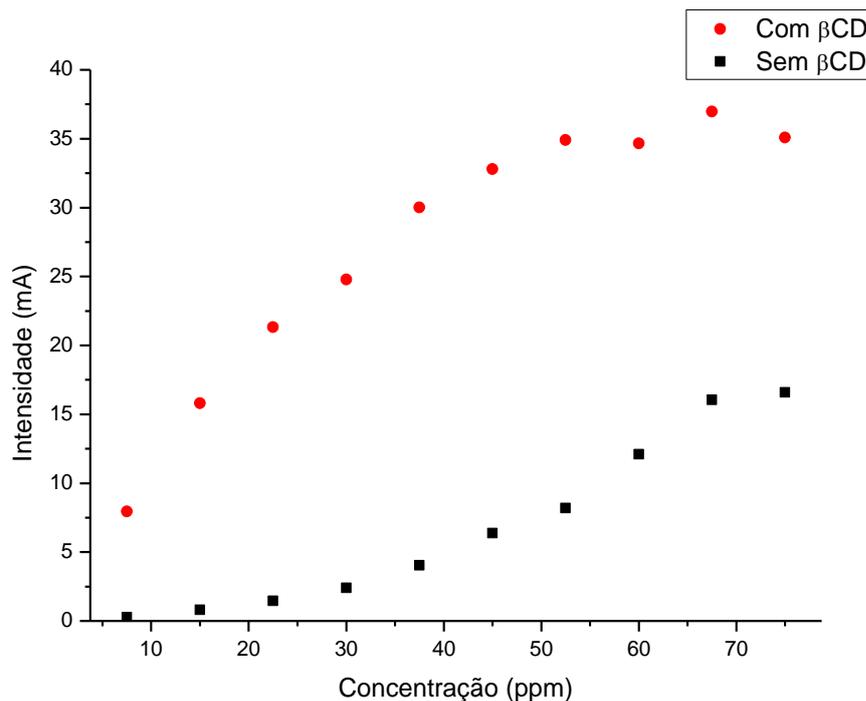
**Figura 5.13:** Sobreposição dos espectros na região do UV-Vis das soluções de trabalho de BFA com  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\beta$ CD.

Os dois  $\lambda_{\text{máx}}$  foram 278 e 226 nm, variando apenas em 1 nm em relação ao teste anterior. Esta pequena diferença foi devida as configurações do equipamento, em que nas primeiras análises o passo de obtenção dos espectros foi menor em relação a esta. Portanto, considera-se que a formação do complexo de

inclusão com a nova concentração de  $\beta$ CD não alterou os espectros de absorção do BFA na região do UV-Vis. Destas mesmas soluções foi realizada a leitura da fluorescência. A FIG. 5.14 (a) apresenta a sobreposição dos espectros de emissão para as soluções de trabalho de BFA com  $\beta$ CD a  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  e a FIG. 5.14 (b) apresenta a comparação entre os espectros de emissão para as soluções de trabalho de BFA sem e com  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\beta$ CD.



(a)



(b)

**Figura 5.14:** (a) Sobreposição dos espectros de emissão das soluções de trabalho de BFA com  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\beta\text{CD}$  (b) Intensidade de fluorescência de BFA sem e com  $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\beta\text{CD}$ .

Nota-se um aumento na resposta de 32 vezes. Comportamento semelhante foi observado na literatura. A intensidade da fluorescência foi aumentada quando a concentração de  $\beta\text{CD}$  foi de  $0,0$  a  $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  [66]. A fluorescência aumentou de 192,2 para 397,4 AU variando a concentração de  $\beta\text{CD}$  de  $0,0$  a  $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$  [50].

A inclusão em CDs exerce um efeito profundo nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, uma vez que são temporariamente bloqueadas ou enjauladas dentro da cavidade hospedeira, dando origem a modificações benéficas das moléculas hóspedes, que de outro modo não seriam alcançáveis. Estas propriedades são: melhoramento da solubilidade de hóspedes altamente insolúveis, estabilização de hóspedes lábeis contra os efeitos degradantes da oxidação, luz visível ou UV e calor, controle de volatilidade e sublimação, isolamento físico de compostos incompatíveis, separação de compostos enantiômeros pela aplicação de CDs nas fase estacionárias de colunas cromatográficas, modificação do sabor mascarando os sabores odores desagradáveis e liberação controlada de drogas e sabor. Por conta disto, as CDs são muito utilizadas em alimentos, produtos

farmacêuticos, cosméticos, proteção ambiental, bioconversão, embalagem e indústria têxtil [49].

## **5.4 – ESTUDO MULTIVARIADO**

### **5.4.1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>**

Visando avaliação do efeito das variáveis críticas do processo de quantificação, foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> (com 8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios), no qual, foi avaliado a influência das variáveis pH, temperatura e força iônica, com a concentração da  $\beta$ CD mantida no seu limite de solubilidade, sobre a resposta em intensidade de fluorescência.

Para a realização do planejamento, a solução de BFA foi fixa em 22,5 ppm e a de  $\beta$ CD de 0,006 mol.L<sup>-1</sup>. O preparo de todas as soluções e a leitura das mesmas no espectrofluorímetro foram realizadas de forma aleatória, e o erro/variação do equipamento foi na segunda casa após a vírgula.

Para a realização das variações da temperatura, foi acoplado um banho termostático no porta cubeta do espectrofluorímetro, de forma que, as leituras só foram realizadas quando a temperatura da amostra na cubeta entrou em equilíbrio com a temperatura do banho, por meio do monitoramento da mesma com termômetro acoplado ao sistema.

Os pHs foram variados pelo tamponamento das amostras com solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico.

Para variação da força iônica, foi adicionado NaCl nas soluções, de forma que a concentração final fosse a de interesse.

A matriz de ensaio com os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR estão apresentados na TAB. 5.3, assim como a resposta em área (integral dos espectros de emissão).

**Tabela 5.3:** Variáveis do DCCR 2<sup>3</sup> com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas sobre a fluorescência de BFA.

| Ensaio | pH <sup>a</sup> | Temp <sup>b</sup> | FI <sup>c</sup> | Área <sup>d</sup> | Área predita <sup>e</sup> | Desvios Relativo(%) <sup>f</sup> |
|--------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1      | -1 (5,0)        | -1 (20,0)         | -1 (0,014)      | 113,912           | 105,57                    | 7,32                             |
| 2      | 1 (7,0)         | -1 (20,0)         | -1 (0,014)      | 105,122           | 105,57                    | -0,43                            |
| 3      | -1 (5,0)        | 1 (30,0)          | -1 (0,014)      | 116,150           | 105,57                    | 9,11                             |
| 4      | 1 (7,0)         | 1 (30,0)          | -1 (0,014)      | 95,960            | 105,57                    | -10,02                           |
| 5      | -1 (5,0)        | -1 (20,0)         | 1 (0,054)       | 120,172           | 105,57                    | 12,15                            |
| 6      | 1 (7,0)         | -1 (20,0)         | 1 (0,054)       | 106,820           | 105,57                    | 1,17                             |
| 7      | -1 (5,0)        | 1 (30,0)          | 1 (0,054)       | 114,322           | 105,57                    | 7,66                             |
| 8      | 1 (7,0)         | 1 (30,0)          | 1 (0,054)       | 97,789            | 105,57                    | -7,96                            |
| 9      | -1,68 (4,3)     | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       | 71,405            | 87,76                     | -22,91                           |
| 10     | +1,68 (7,7)     | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       | 97,325            | 87,76                     | 9,83                             |
| 11     | 0 (6,0)         | -1,68 (16,6)      | 0 (0,034)       | 120,322           | 115,31                    | 4,17                             |
| 12     | 0 (6,0)         | +1,68 (33,4)      | 0 (0,034)       | 107,297           | 115,31                    | -7,47                            |
| 13     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | -1,68 (0,000)   | 112,884           | 115,31                    | -2,15                            |
| 14     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | +1,68 (0,068)   | 111,458           | 115,31                    | -3,46                            |
| 15     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       | 114,364           | 115,31                    | -0,83                            |
| 16     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       | 117,523           | 115,31                    | 1,88                             |
| 17     | 0 (6,0)         | 0 (25,0)          | 0 (0,034)       | 115,211           | 115,31                    | -0,09                            |

<sup>a</sup> pH; <sup>b</sup> temperatura (°C); <sup>c</sup> força iônica (mol.L<sup>-1</sup>);

<sup>d</sup> Resposta em área (integral da banda);

<sup>e</sup> Valores de área preditos pelo modelo;

<sup>f</sup> Desvio Relativo=  $((Y - \hat{Y})/Y)*100$ ; onde Y= resposta experimental e  $\hat{Y}$ = resposta prevista pelo modelo.

Preferiu-se a utilização da área (integral do espectro de emissão) como resposta ao invés da intensidade de fluorescência, pelo fato de que, qualquer desvio que pudesse provocar o deslocamento da banda, o uso da integral corrigiria, e a resposta seria corrigida.

Pode-se verificar que a resposta da fluorescência, em área, variou de 71,405 a 120,322. Os pontos centrais apresentaram desvio padrão relativo (DPR) de  $\pm 1,41$ . Segundo a AOAC - *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, para o nível de concentração de 10<sup>-5</sup> de fração de massa, a DPR preconizada é de, no máximo, 7,3 [67]. Considerando o nível de concentração da amostra, os pontos centrais indicaram que houve uma boa repetibilidade.

Pela análise do planejamento, constatou-se que quando as variáveis força iônica e temperatura estavam fixas no ponto central e o pH passou do nível -1,68 para o +1,68, houve efeito positivo na resposta. Todas as vezes que o pH passou do nível -1 para o +1, independente dos níveis das demais variáveis, o efeito foi negativo.

Em relação a temperatura, quando mesma passou do nível  $-1,68$  para o nível  $+1,68$  com as demais variáveis fixas no ponto central, houve efeito negativo. No geral, verificou-se que a baixa temperatura apresentou efeito positivo na resposta (níveis  $-1$  e  $-1,68$ ).

Em relação a força iônica, quando a mesma passou do nível  $-1,68$  para o  $+1,68$ , com as demais variáveis fixas no ponto central, não houve mudança na resposta (dentro do DPR). É possível constatar que as maiores respostas ocorreram quando a faixa de estudo do pH estava nos níveis  $-1$  e  $0$  e a temperatura entre os níveis  $-1$  e  $-1,68$ . Os níveis da força iônica aparentemente, não contribuíram para o aumento ou decréscimo da resposta (dentro do erro dos pontos centrais).

Para confirmar se tais efeitos foram significativos ou não, determinou-se sua significância a 95% de confiança. A TAB. 5.4 apresenta os efeitos das variáveis e sua significância, sobre a resposta integral da banda de emissão da fluorescência.

**Tabela 5.4:** Análise dos efeitos das variáveis do planejamento  $2^3$  sob a fluorescência.

|          | Efeito <sup>a</sup> | Erro | t-valor | p-valor   |
|----------|---------------------|------|---------|-----------|
| Média    | 115,29              | 6,51 | 17,7    | < 0,0000* |
| pH (L)   | -2,25               | 6,12 | -0,37   | 0,7246    |
| pH (Q)   | -19,48              | 6,75 | -2,89   | < 0,0234* |
| Temp (L) | -6,4                | 6,12 | -1,05   | 0,3304    |
| Temp (Q) | 1,38                | 6,75 | 0,21    | 0,8432    |
| FI (L)   | 0,82                | 6,12 | 0,13    | 0,8978    |
| FI (Q)   | 0,22                | 6,75 | 0,03    | 0,9745    |
| pH*Temp  | -3,65               | 8,00 | -0,46   | 0,6623    |
| pH*FI    | -0,23               | 8,00 | -0,03   | 0,9782    |
| Temp*FI  | -1,99               | 8,00 | -0,25   | 0,8107    |

<sup>a</sup>Os efeitos são apresentados em área; \* $p \leq 0,05$ .

L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Considerando um nível de significância de 95% de confiança, verificou-se que apenas o termo quadrático da variável pH apresentou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ). As demais variáveis e as interações entre elas não apresentaram efeito significativo, na faixa estudada, sobre a resposta ( $p \geq 0,05$ ).

Dizer que apenas o termo quadrático da variável pH foi significativo, significa dizer que os níveis de  $-1,68$  a  $+1,68$  apresentaram efeito negativo, de  $-19,48$  em área, significativo na resposta, e que os níveis de  $-1$  a  $+1$  não apresentaram efeito significativo.

Em relação as demais variáveis, a 95% de confiança seu efeito não foi significativo. Porém, analisando o planejamento, verificou-se uma variação na resposta de alta amplitude (71,405 a 120,322), sempre quando houve mudança das variáveis pH e temperatura, diferentemente da força iônica. Além disto, na prática, verificou-se um impacto muito grande da temperatura na resposta, além do que, sabe-se que a temperatura é uma variável muito importante a se considerar quando se trabalha com a fluorescência de compostos, já que a variação da mesma promove o aumento ou a diminuição dos relaxamentos vibracionais e perda de eficiência por processos não radiativos.

Apesar da temperatura não apresentar significância, seu impacto visto na prática indica trabalhar na melhor condição operacional, ou seja, nas menores temperaturas, pH nos termos lineares e ausência da FI.

Após a avaliação do efeito das variáveis sobre a resposta, foi possível obter o modelo que representa o processo de quantificação em função das variáveis estudadas. Os coeficientes obtidos estão apresentados na TAB. 5.5.

**Tabela 5.5:** Coeficientes de regressão do modelo quadrático para a resposta intensidade de fluorescência.

|          | Regressão | Erro | t-valor | p-valor |
|----------|-----------|------|---------|---------|
| Média    | 115,29    | 5,56 | 20,75   | 0,0000* |
| pH (L)   | -1,12     | 2,61 | -0,43   | 0,6762  |
| pH (Q)   | -9,74     | 2,88 | -3,39   | 0,0069* |
| Temp (L) | -3,2      | 2,61 | -1,22   | 0,2481  |
| Temp (Q) | 0,69      | 2,88 | 0,24    | 0,8146  |
| FI (l)   | 0,41      | 2,61 | 0,16    | 0,8790  |
| FI(Q)    | 0,11      | 2,88 | 0,03    | 0,9689  |

\*p≤0,05. L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Foi mantido no modelo os coeficientes significativos e obteve-se a equação (5), que representa o modelo quadrático da fluorescência em função das variáveis estudadas. Para avaliação da significância do modelo, foi realizado o teste da ANOVA (TAB. 5.6) e também análise dos resíduos. Os parâmetros não considerados no modelo, ou seja, não significativos, foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na TAB. 5.6.

$$y = 115,29 - 9,74\text{pH}^2 \quad \text{Equação (5)}$$

**Tabela 5.6:** ANOVA do modelo quadrático para área fluorescência.

|           | gl <sup>a</sup> | SQ <sup>b</sup> | MQ <sup>c</sup> | F cal | F tab | P - Valor |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-----------|
| Regressão | 6               | 1442,90         | 240,48          | 2,59  | 3,22  | 0,0886    |
| Resíduo   | 10              | 929,70          | 92,97           |       |       |           |
| Total     | 16              | 2372,60         | 148,29          |       |       |           |

<sup>a</sup> graus de liberdade; <sup>b</sup> soma de quadrados; <sup>c</sup> quadrados médios.

Considerando as hipóteses nula e alternativa:

$H_0$ : Regressão nula; todos os regressores são iguais à zero;

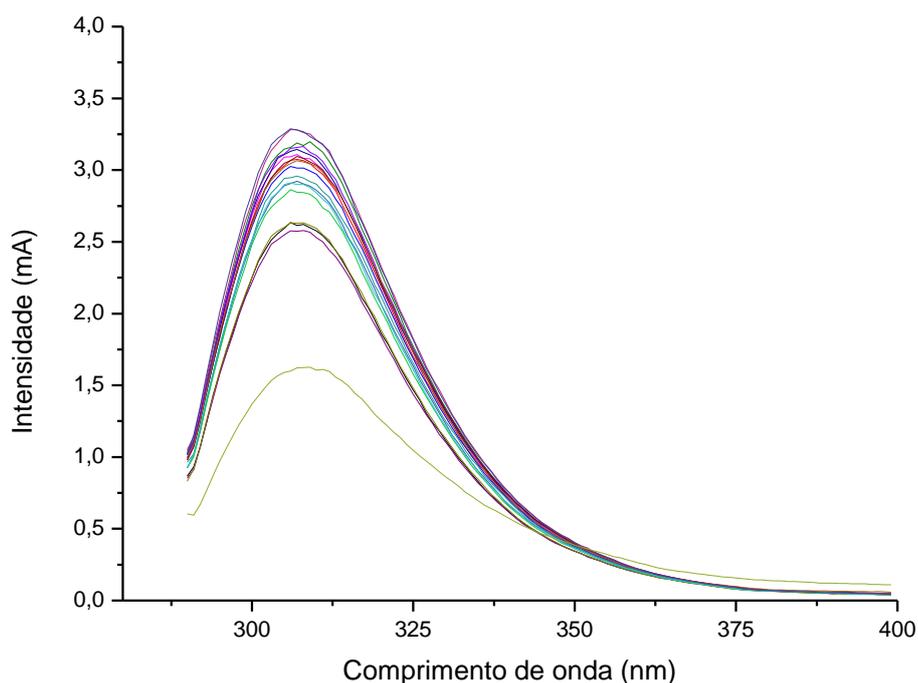
$H_1$ : Regressão não nula; dados regressores diferente de zero;

Como o F calculado para a regressão foi menor que o Ftabelado, aceita-se a hipótese nula e rejeita-se a hipótese alternativa. Logo os dados experimentais não se ajustaram aos dados obtidos pelo modelo e não podemos afirmar que a quantidade de variação devida ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada (resíduos), não sendo possível construir a superfície de resposta. Assim, como a ANOVA não foi significativa, não foi possível mostrar uma equação de modelo de segunda ordem para este projeto.

Assim, como mencionado anteriormente, a faixa ideal de pH para a maior resposta em fluorescência ocorreu nos termos lineares de -1 a +1, ou seja, na faixa de 5,0 a 7,0, já que o efeito negativo dos termos quadráticos foi significativo. Além disto, a melhor condição operacional da temperatura foi nas menores temperaturas, pois as maiores respostas estão nos níveis inferiores -1 e -1,68. Assim, uma faixa de 16,6 a 20 °C indicam uma melhor condição operacional. Como a força iônica não apresentou nenhuma condição operacional impactante nem significativa, na faixa estudada, sua ausência ou presença apresentou-se irrelevante.

Portanto, a melhor condição operacional foi nas menores temperaturas, ausência da FI e pH nos termos lineares. A indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada [68].

A FIG. 5.15 apresenta a sobreposição dos espectros de emissão obtidos na condução do planejamento experimental.

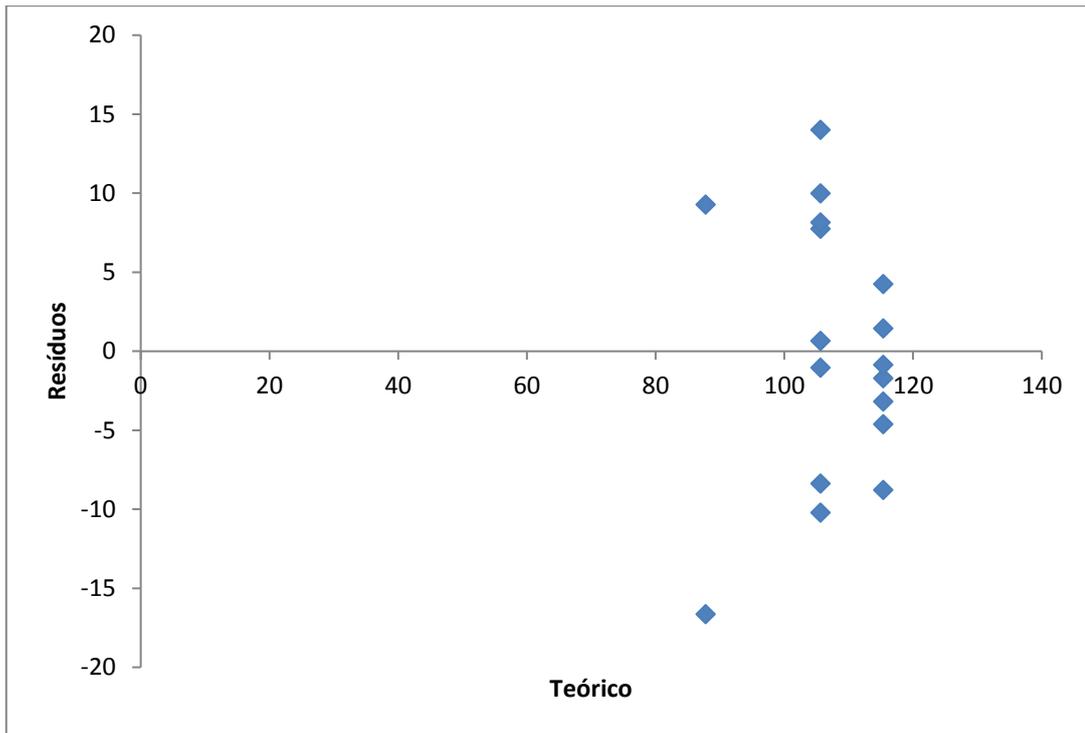


**Figura 5.15:** Sobreposição dos espectros de emissão do planejamento experimental  $2^3$ .

A fim de verificar o porquê de a variação dos resíduos ser significativamente maior do que a variação devido ao modelo, foi realizado uma avaliação dos resíduos (que é diferença entre os dados experimentais e o teórico predito pelo modelo).

A FIG. 5.16 apresenta o gráfico dos resíduos. Observou-se que em um ponto o ajuste do modelo apresentou um erro maior em relação aos demais pontos, que é referente ao ensaio 9 do planejamento, onde o desvio relativo foi maior para este ensaio (como visto na TAB. 5.3). Este maior desvio, em relação aos demais, ocorreu quando a variável pH passou do nível 1 para o - 1,68, e nesta variação o ajuste do modelo não foi adequado.

Por conta disto, foi realizado o teste de Grubbs para a detecção de *outliers* nos resíduos, para confirmar, se de fato, este ensaio é um *outlier*.



**Figura 5.16:** Gráfico de resíduos do ajuste do modelo quadrático.

Assim, para avaliação dos resíduos, foi aplicado o teste Grubbs para a detecção de *outliers* nos resíduos. Este teste tem a finalidade de verificar a presença de valores extremos em observações amostrais. Valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, ou apenas um erro no cálculo durante o recolhimento dos dados e até mesmo uma anotação precipitada pelo operador. No teste de Grubbs, é usado a seguinte estatística [69]:

$$G \text{ calculado} = (x_i - \bar{x}) / S \quad \text{Equação (6)}$$

Em que:

$x_i$  é uma observação da amostra  $x_1, x_2, \dots, x_n$ ;

$\bar{x}$  é a média amostral;

S é o desvio padrão amostral;

A estatística testa as seguintes hipóteses:

$H_0$ :  $x_i$  é uma observação considerada valor extremo;

$H_1$ :  $x_i$  não é uma observação considerada valor extremo;

Rejeitamos a hipótese  $H_0$ , com nível de significância  $\alpha$ , se  $G \text{ calculado} \geq G \text{ crítico}$ . O valor de  $G \text{ crítico}$  é o valor crítico baseado na distribuição de Z.

A TAB. 5.7 apresenta a avaliação dos resíduos e a TAB. 5.8 a avaliação do teste de Grubbs.

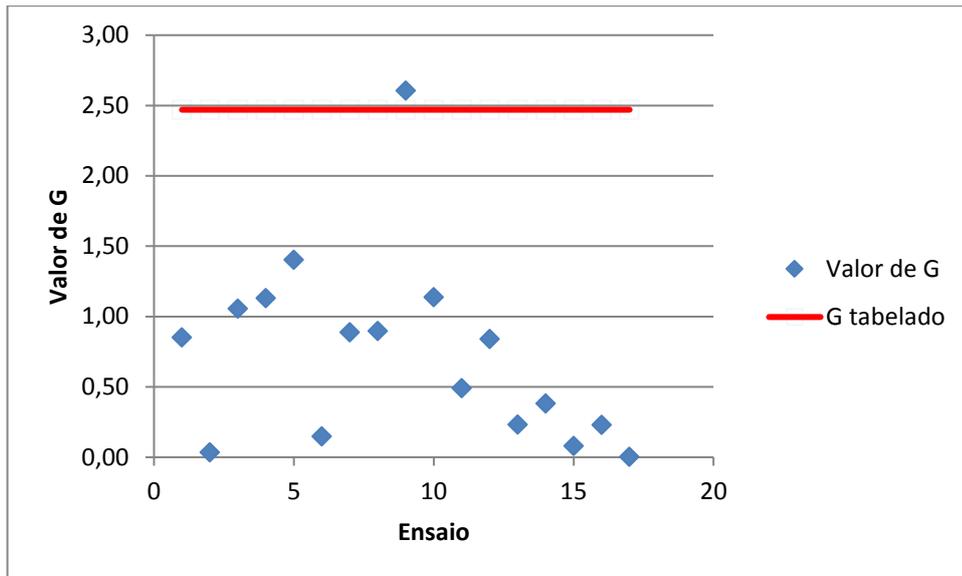
**Tabela 5.7:** Teste Grubbs.

| Ensaio | Teórico | Experimental | Resíduo | Valor G | G tabelado |
|--------|---------|--------------|---------|---------|------------|
| 1      | 105,57  | 113,91       | 7,32    | 0,85    |            |
| 2      | 105,57  | 105,12       | -0,43   | 0,04    |            |
| 3      | 105,57  | 116,15       | 9,11    | 1,06    |            |
| 4      | 105,57  | 95,96        | -10,02  | 1,13    |            |
| 5      | 105,57  | 120,17       | 12,15   | 1,40    |            |
| 6      | 105,57  | 106,82       | 1,17    | 0,15    |            |
| 7      | 105,57  | 114,32       | 7,66    | 0,89    |            |
| 8      | 105,57  | 97,79        | -7,96   | 0,90    |            |
| 9      | 87,76   | 71,41        | -22,91  | 2,61    | 2,47       |
| 10     | 87,76   | 97,33        | 9,83    | 1,14    |            |
| 11     | 115,31  | 120,32       | 4,17    | 0,49    |            |
| 12     | 115,31  | 107,30       | -7,47   | 0,84    |            |
| 13     | 115,31  | 112,88       | -2,15   | 0,23    |            |
| 14     | 115,31  | 111,46       | -3,46   | 0,38    |            |
| 15     | 115,31  | 114,36       | -0,83   | 0,08    |            |
| 16     | 115,31  | 117,52       | 1,88    | 0,23    |            |
| 17     | 115,31  | 115,21       | -0,09   | 0,00    |            |

**Tabela 5.8:** Tabela Grubbs.

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Alfa            | 0,05  |
| Tamanho         | 17    |
| Valor signif.   | 0,003 |
| Graus Liberdade | 15    |
| t-crítico       | 3,21  |
| G-crítico       | 2,47  |

A FIG. 5.17 apresenta a avaliação gráfica do teste G para a detecção de *outliers* nos resíduos.



**Figura 5.17:** Avaliação resíduos teste G.

Verifica-se que o ensaio 9 é um valor extremo, sendo este ensaio a variável pH no nível – 1,68 que apresentou a menor resposta do planejamento.

Em análise de regressão, a resposta observada de alguns casos pode não corresponder ao modelo ajustado aos dados, neste caso, dizemos que esta resposta é um *outlier* ou valor extremo. No caso do ensaio 9, este ensaio possivelmente foi detectado como *outlier* pela devida variação brusca do processo, onde viu-se que o pH tem muito efeito sobre a resposta, e o modelo quadrático não ajustou-se muito bem para este ensaio, do que em relação aos demais ensaios. É possível confrontar este valor também como os desvios relativos do modelo apresentados na TAB. 5.3, que para o ensaio 9 foi de aproximadamente que 23%.

Esta condição invalidou o modelo obtido, pois como apresentado no teste da ANOVA, a variação devida ao modelo não foi significativamente maior que a variação não explicada (resíduos). Se o modelo fosse melhor ajustado para o ensaio 9, obter-se-ia um  $R^2$  ou variação explicada mais próximo de 100, e seria possível de obter a superfície de resposta.

O não ajuste do modelo é tão visível no ensaio 9 que se verifica a mesma resposta predita pelo modelo para os níveis -1,68 e 1,68 (TAB. 5.3), sendo o resultado experimental totalmente diferente, divergindo não só com este, mas também com o cálculo de efeitos apresentado na TAB. 5.4, onde foi visto uma variação significativa e negativa no nível quadrático, variação esta que o modelo deveria prever.

## 5.5 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

### 5.5.1 – Ajuste modelo linear

Após avaliação do efeito das variáveis pelo planejamento experimental, realizou-se a determinação da curva padrão, para avaliação da linearidade, nas regiões ótimas que promoveram o aumento da resposta.

Assim, as leituras das soluções da curva padrão foram realizadas na faixa de temperatura de 16,6 a 19 °C, com o pH das soluções fixo em 6,0 (dentro da faixa linear de 5,0 a 7,0) e na ausência da força iônica.

A linearidade foi verificada através de uma curva analítica de 7 níveis equidistantes e 3 réplicas de cada nível, compreendendo o intervalo de 7,5 a 75,0 ppm. Desta forma, foi abrangido o intervalo para avaliação da amostra em concentrações de 7,5 a 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do analito de interesse. A curva padrão foi constituída a partir de uma solução estoque de concentração de 150 ppm e diluída para sete níveis, transferindo os volumes conforme TAB. 5.9 para balão volumétrico de 10 mL.

Para manter o pH das soluções constante, as amostras foram tamponadas com tampão fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico, de forma que o pH final fosse 6,0. A concentração da  $\beta\text{CD}$  foi mantida no limite de solubilidade.

**Tabela 5.9:** Curva calibração 1.

| Nível | Volume Pipetado* (mL) | Concentração BFA (ppm) |
|-------|-----------------------|------------------------|
| 1     | 0,50                  | 7,50                   |
| 2     | 1,25                  | 18,75                  |
| 3     | 2,00                  | 30,00                  |
| 4     | 2,75                  | 41,25                  |
| 5     | 3,50                  | 52,50                  |
| 6     | 4,25                  | 63,75                  |
| 7     | 5,00                  | 75,00                  |

\* Volume pipetado da solução estoque 150 ppm.

As leituras foram realizadas de forma aleatória e os dados obtidos estão apresentados na TAB. 5.10 e a curva analítica na FIG. 519.

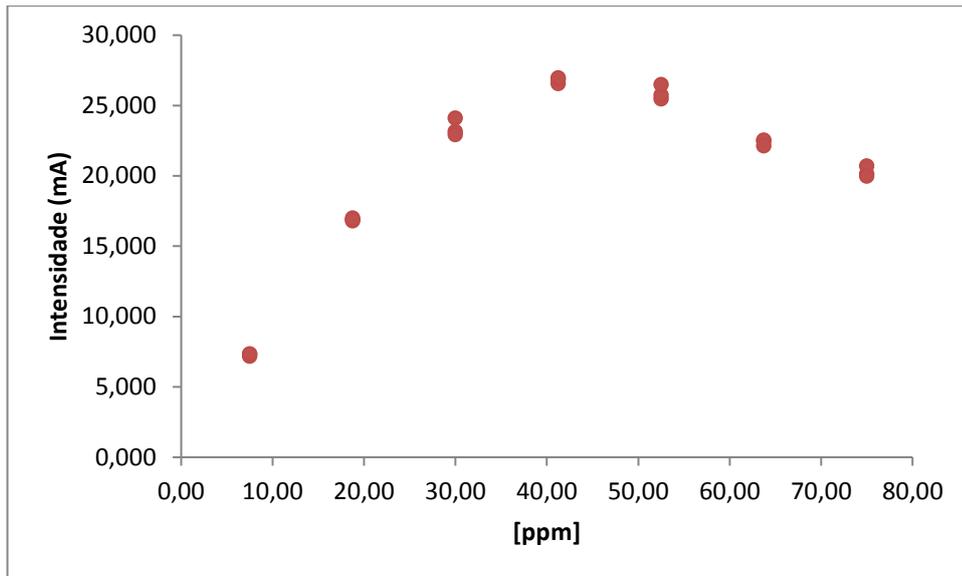
**Tabela 5.10:** Linearidade 1.

| Nível* | Resposta** | DPR  | Espec.*** |
|--------|------------|------|-----------|
| 7,50   | 7,346      | 1,27 | 3,7       |
|        | 7,186      |      |           |
|        | 7,346      |      |           |
| 18,75  | 16,999     | 0,58 | 2,7       |
|        | 16,802     |      |           |
|        | 16,889     |      |           |
| 30,00  | 24,108     | 2,65 |           |
|        | 23,164     |      |           |
|        | 22,939     |      |           |
| 41,25  | 26,564     | 0,78 |           |
|        | 26,869     |      |           |
|        | 26,965     |      |           |
| 52,50  | 25,474     | 2,02 |           |
|        | 25,746     |      |           |
|        | 26,484     |      |           |
| 63,75  | 22,474     | 0,96 |           |
|        | 22,538     |      |           |
|        | 22,137     |      |           |
| 75,00  | 20,132     | 1,91 |           |
|        | 20,709     |      |           |
|        | 19,971     |      |           |

\* ppm; \*\* Intensidade de fluorescência (mA); \*\*\* Conforme recomendação para reprodutibilidade para fração de massa  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  [67].

O novo modelo obtido não apresentou mais variações entre os mesmos níveis como obtia-se anteriormente, confirmando que as variáveis temperatura e pH são críticas para modelagem do processo e que seu controle faz-se necessário. Isto foi confirmado por meio da DPR de cada nível da curva, conforme TAB. 5.10, que atendeu a especificação, além da verificação no momento da análise a reprodução das leituras de cada cubeta.

Após a obtenção dos dados experimentais da linearidade, levantou-se a curva analítica, apresentada na FIG. 5.18.



**Figura 5.18:** Curva analítica obtida no espectrofluorímetro.

Como pode ser visto na FIG. 5.18, não foi obtido um modelo linear e sim uma curva exponencial, verificando-se que a faixa de estudo estava fora da faixa linear do equipamento (7,5 – 75 ppm) indicando que as concentrações estavam altas. Os três primeiros pontos da curva davam indício de um comportamento linear, por conta disto, foi expandido uma nova faixa de trabalho dentro destes 3 pontos.

Os efeitos de filtro interno também podem ser observados na FIG. 5.18, que é quando o feixe de excitação não consegue excitar todas as moléculas devido às altas concentrações, e a emissão das que foram excitadas não são detectadas, pois acabam por excitar as moléculas que não foram excitadas anteriormente. Este comportamento pode ser visualizado no decaimento da resposta na curva.

Por conta, disto, uma nova faixa de concentração de estudo foi proposta: 7,5 a 26,25 ppm. A curva constituiu-se de 7 pontos equidistantes entre si, a partir de 3 soluções mães à 150 ppm. As diluições foram realizadas conforme a TAB. 5.11 para balão volumétrico de 10 mL.

**Tabela 5.11:** Curva calibração 2.

| Nível | Volume Pipetado* (mL) | Concentração BFA (ppm) |
|-------|-----------------------|------------------------|
| 1     | 0,25                  | 3,75                   |
| 2     | 0,50                  | 7,50                   |
| 3     | 0,75                  | 11,25                  |
| 4     | 1,00                  | 15,00                  |
| 5     | 1,25                  | 18,75                  |
| 6     | 1,50                  | 22,50                  |
| 7     | 1,75                  | 26,25                  |

\* Volume pipetado da solução estoque 150 ppm.

As leituras foram realizadas de forma aleatória e os dados obtidos estão apresentados na TAB. 5.12 e a curva analítica na FIG. 5.19.

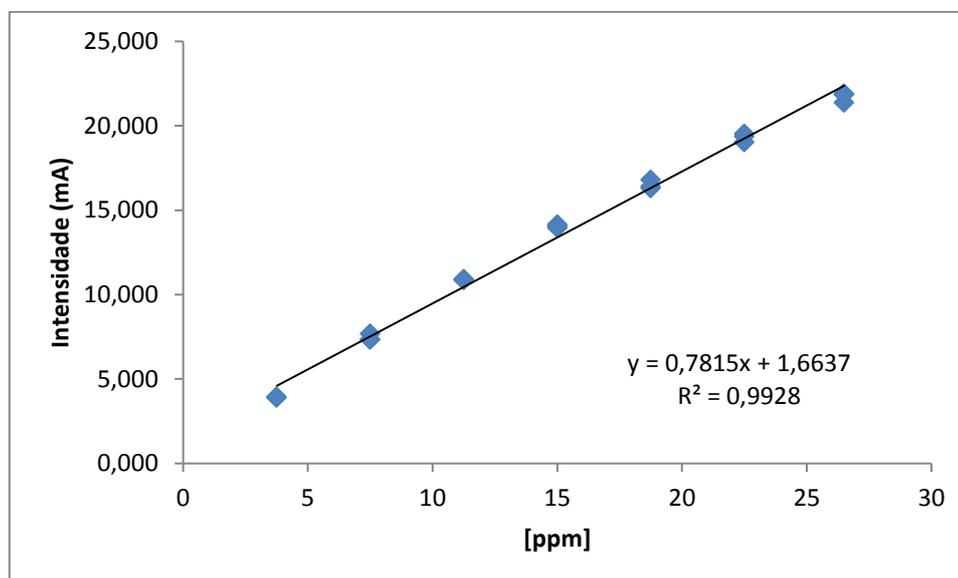
**Tabela 5.12:** Linearidade 2.

| Nível* | Resposta** | DPR  | Espec.*** |
|--------|------------|------|-----------|
| 3,75   | 3,926      | 0,45 | 3,7       |
|        | 3,909      |      |           |
|        | 3,944      |      |           |
| 7,50   | 7,346      | 2,70 |           |
|        | 7,696      |      |           |
|        | 7,346      |      |           |
| 11,25  | 10,890     | 0,32 |           |
|        | 10,933     |      |           |
|        | 10,864     |      |           |
| 15,00  | 14,169     | 0,69 |           |
|        | 13,975     |      |           |
|        | 14,073     |      |           |
| 18,75  | 16,802     | 1,54 |           |
|        | 16,420     |      |           |
|        | 16,319     |      |           |
| 22,50  | 19,381     | 1,30 |           |
|        | 19,036     |      |           |
|        | 19,523     |      |           |
| 26,25  | 21,905     | 1,35 |           |
|        | 21,378     |      |           |
|        | 21,865     |      |           |

\* ppm; \*\* Intensidade de fluorescência (mA); \*\*\*Conforme recomendação para reprodutibilidade para fração de massa  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  [67].

O novo modelo obtido também não apresentou mais variações entre os mesmos níveis, confirmando novamente que o controle das variáveis pH e temperatura faz-se necessário, conforme DPR de cada nível da curva.

Após a obtenção dos dados experimentais levantou-se a curva analítica, apresentada na FIG. 5.19, onde se verificou a faixa linear.



**Figura 5.19:** Faixa linear da curva de emissão de BFA +  $\beta$ CD.

Para atestar a significância do modelo linear os dados foram tratados com o auxílio do software *Stat Camp* do portal Action – item validação analítica - Linearidade [69].

A comprovação da significância do coeficiente angular é fundamental para que seja demonstrada a linearidade do método. Tal avaliação é realizada por meio do teste F da análise de variância (ANOVA). A ANOVA permite avaliar se uma determinada reta de regressão estimada explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e a resposta, e também, apresenta fatores diferentes para o cálculo, dependendo do método utilizado (método dos mínimos quadrados ordinários - MMQO ou método dos mínimos quadrados ponderados - MMQP) [70].

A ANOVA é realizada por meio da avaliação de todas as fontes de variação do sistema:

- ✓ Regressão: variação das respostas analíticas em relação ao centroide (amplitude do modelo);
- ✓ Resíduos: variação das respostas analíticas reais em relação ao modelo (erros);
- ✓ Total: soma das variações da regressão e dos resíduos.

Para que seja comprovado que  $y$  realmente varia em função de  $x$  (comprovação fundamental para a linearidade), é necessário demonstrar que a variação devida à regressão (modelo) é suficientemente maior que a devida ao erro (resíduos) [70].

Sendo assim, para avaliar a significância do modelo obtido, foi utilizado o teste F da ANOVA para testar as seguintes hipóteses:

$H_0$ : coeficiente angular igual à zero;

$H_1$ : coeficiente angular diferente de zero.

A TAB. 5.13 apresenta a ANOVA para o modelo linear.

**Tabela 5.13:** ANOVA modelo linear.

|           | gl <sup>a</sup> | SQ <sup>b</sup> | MQ <sup>c</sup> | F cal   | Ftab | p - Valor |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|------|-----------|
| Regressão | 1               | 731,86          | 731,86          | 2623,35 | 4,54 | 0,0000*   |
| Resíduo   | 19              | 5,30            | 0,28            |         |      |           |
| Total     | 20              | 737,16          | 732,14          |         |      |           |

\*  $p \leq 0,05$  <sup>a</sup> graus de liberdade; <sup>b</sup> soma de quadrados; <sup>c</sup> quadrados médios.

Como  $F_{calculado}$  da ANOVA foi significativo e maior que o  $F_{tabelado}$ , não se rejeitou a significância do modelo linear ao nível 5%. Logo, aceitou-se a hipótese alternativa de que o coeficiente angular é diferente de zero e rejeitou-se a hipótese nula.

O intercepto (coeficiente linear) também foi avaliado. A avaliação do coeficiente linear pode trazer informação importante, dependendo do método que está sendo validado. Recomenda-se que seja verificado, por meio do teste t, se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero [70].

Assim foi utilizando a estatística t de Student e que foram testadas as hipóteses:

$H_0$ : intercepto (coeficiente linear) igual à zero;

$H_1$ : intercepto diferente de zero.

A TAB. 5.14 traz as estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) e também a estatística t:

**Tabela 5.14:** Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto.

|            | Estimativa | Desvio Padrão | Estat.t | p-valor |
|------------|------------|---------------|---------|---------|
| Intercepto | 1,6638     | 0,2567        | 6,4802  | 0,0000* |
| Nível      | 0,7815     | 0,0153        | 51,2187 | 0,0000* |

\*  $p \leq 0,05$

Como p-valor do teste t é menor que 0,05, não se rejeitou a significância do intercepto ao nível 5%.

É esperado que o coeficiente linear não seja estatisticamente diferente de zero. Caso ele seja, é importante fazer uma avaliação do impacto deste resultado na linearidade do método. Recomenda-se considerar, entre outros fatores, o valor do coeficiente linear em relação às concentrações testadas e a possível interferência do diluente ou de outras substâncias no sinal analítico que está sendo avaliado. Em geral, a linearidade do método precisará ser reavaliada quando o valor do coeficiente linear for estatisticamente diferente de zero e tiver magnitude significativa para o sinal analítico na concentração de trabalho. Além disso, caso seja encontrado intercepto estatisticamente diferente de zero e com magnitude significativa frente às respostas analíticas, é recomendável que se utilize uma curva analítica ao invés de um ponto único para padronização na rotina de análise [70].

Para avaliação do grau de proporcionalidade entre a variável explicativa e a variável resposta, foi obtido o coeficiente de correlação de Pearson, apresentado na TAB. 5.15.

**Tabela 5.15:** Medida descritiva da qualidade do ajuste.

| Desvio Padrão dos Resíduos | Graus de Liberdade | R <sup>2</sup> | Coefficiente de Correlação |
|----------------------------|--------------------|----------------|----------------------------|
| 0,5282                     | 19                 | 0,9928         | 0,9964                     |

Como o coeficiente de correlação foi de 0,9964, constatou-se que existe uma relação linear adequada.

#### 5.5.1.1 Análise dos resíduos do modelo linear

Após a verificação do ajuste do modelo linear, foi realizado o diagnóstico dos resíduos. As análises estatísticas para os resíduos compreenderam os seguintes teste:

- ✓ Teste de Anderson-Darling para a normalidade, ou seja, para verificar se os resíduos seguem uma distribuição normal;
- ✓ Teste de Breusch Pagan para avaliação da homocedasticidade (variâncias constantes);
- ✓ Análise dos resíduos padronizados e/ou studentizados, para verificação de valores aberrantes ou pontos extremos na resposta;

- ✓ Avaliação dos pontos influentes por meio dos testes: Distância de COOK, DFBETA e DFFITS.

Para averiguar a normalidade foi aplicado o teste de Anderson-Darling, apresentado na TAB. 5.16, assumindo as seguintes hipóteses:

$H_0$ : Os resíduos seguem uma distribuição normal;

$H_1$ : Os resíduos não seguem uma distribuição normal.

**Tabela 5.16:** Teste de Normalidade.

|                  | Estatística | P-valor |
|------------------|-------------|---------|
| Anderson-Darling | 0,3531      | 0,4313  |

Como o p-valor de 0,4313 do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não se rejeitou a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de confiança de 95%. Portanto, os resíduos seguem uma distribuição normal.

Para avaliação da homocedasticidade, ou seja, se as variâncias são constantes, foi aplicado o teste de Breusch Pagan para atestar as hipóteses:

$H_0$ : Variâncias dos níveis são iguais;

$H_1$ : Pelo menos uma variância diferente.

A TAB. 5.17 apresenta o teste de Teste de Breusch Pagan.

**Tabela 5.17:** Teste de homocedasticidade.

| Estatística | GL | P-valor |
|-------------|----|---------|
| 0,0034      | 1  | 0,9537  |

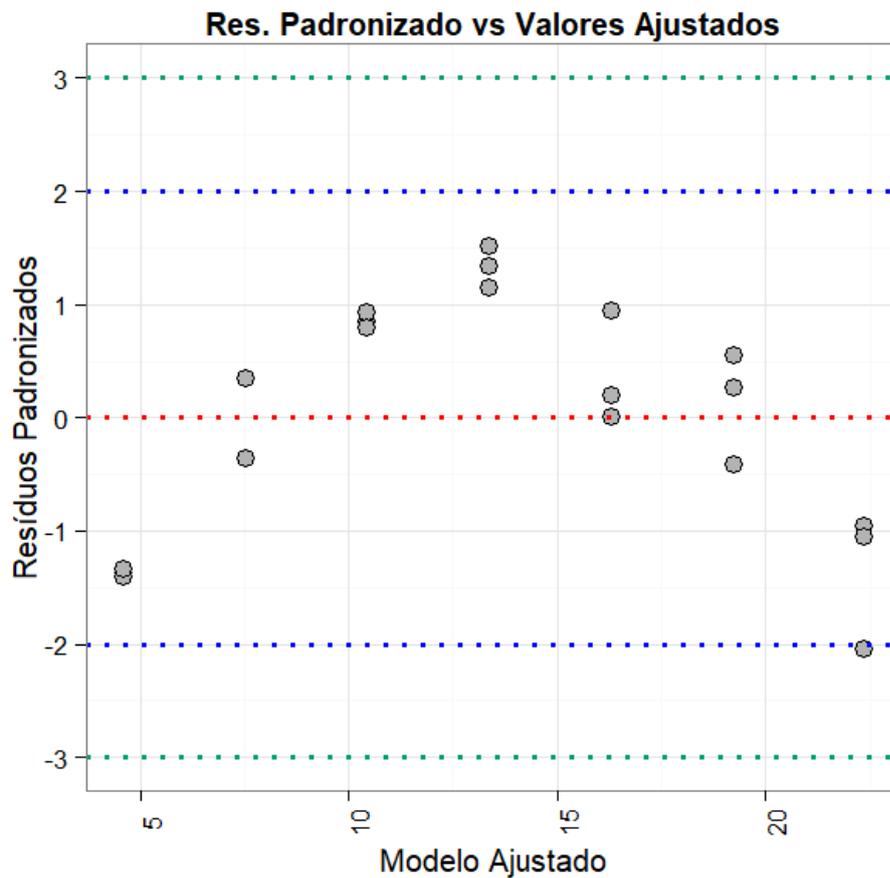
Como P-valor de 0,9537 do teste de Breusch Pagan é maior que 0,05, não se rejeitou a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Ou seja, aceitou-se a hipótese nula que diz que o modelo é homocedástico, e a variância é constante para todos os níveis.

Para escolha do método a ser utilizado, deve se considerar a variância dos resultados de  $y$  para cada valor de  $x$ . Se a variância de  $y$  for constante (situação denominada homocedasticidade), pode-se utilizar o MMQO. Caso sejam observadas alterações de variância de  $y$  (situação denominada heterocedasticidade), é recomendável que se utilize o MMQP, pois a utilização do MMQO poderá gerar resultados tendenciosos [70].

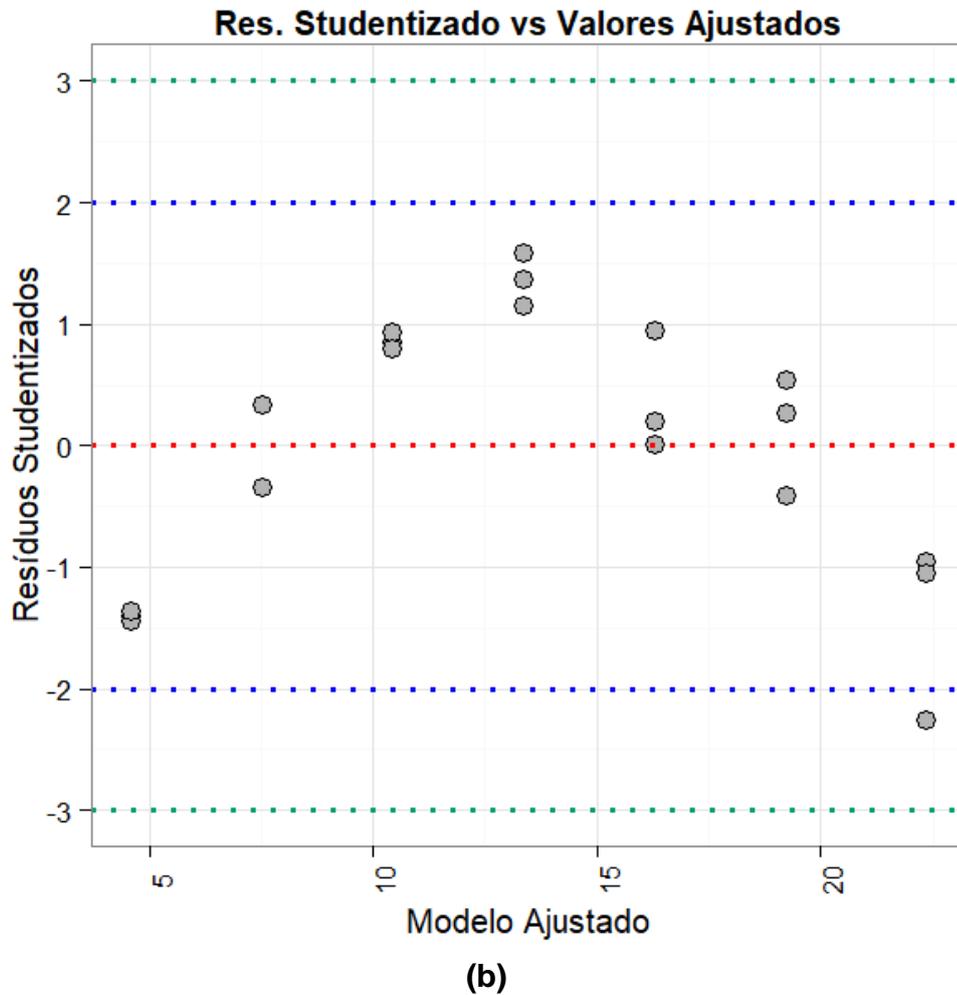
Como as variâncias apresentaram-se constantes, foi correto utilizar a estimação dos coeficientes do modelo pelo MMQO.

Os valores extremos na resposta também foram verificados por meio da avaliação dos resíduos padronizados e dos resíduos studentizados. Como critério, geralmente é considerado valores extremos na resposta as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3 [69].

A FIG. 5.20 (a) apresenta os resíduos padronizados e a FIG. 5.20 (b) os studentizados.



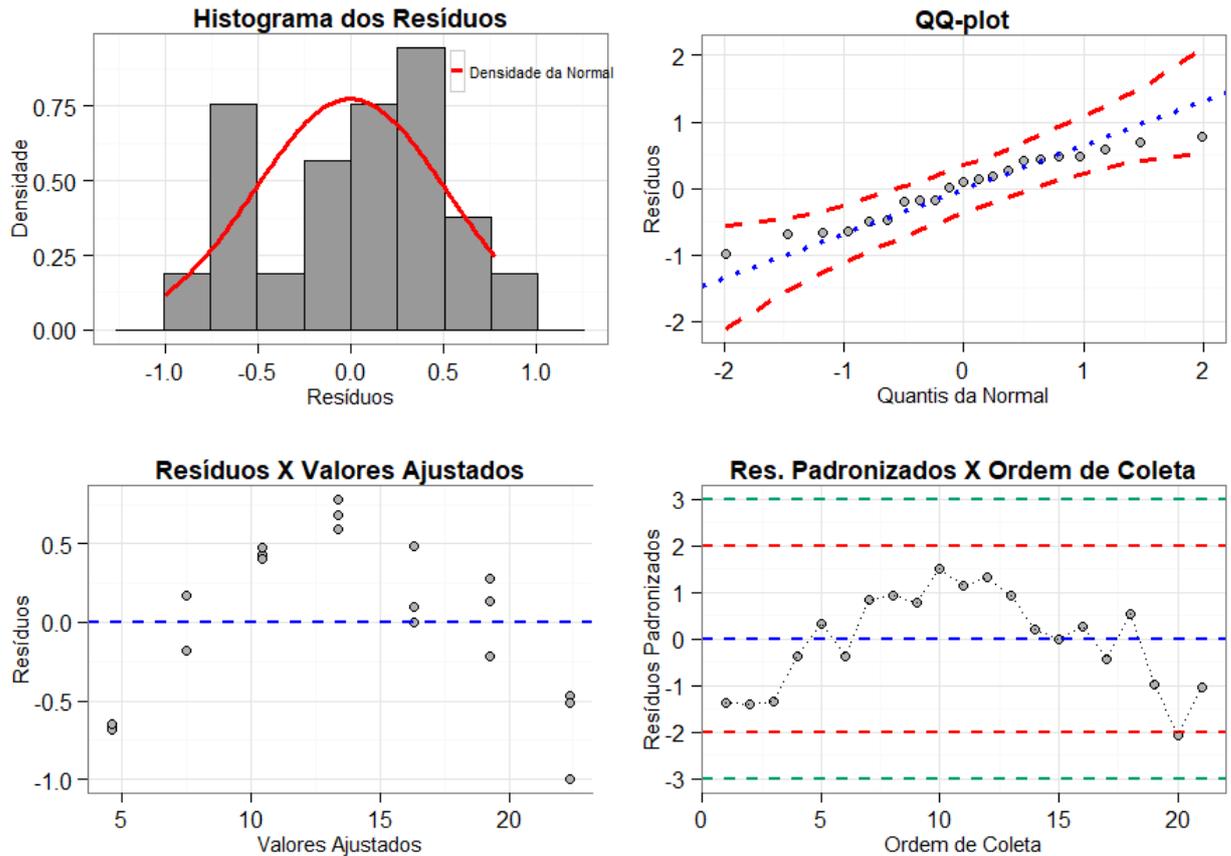
(a)



**Figura 5.10:** Análise resíduos padronizados (a) e resíduos studentizados (b).

Pela avaliação gráfica da FIG. 5.20, não foram detectados valores extremos nos resíduos, portanto, nenhuma observação apresentou grandes afastamentos das demais da série de dados, indicando que o ajuste do modelo foi equivalente para todas as observações.

Um resumo da análise dos resíduos, de forma gráfica, é apresentado na FIG. 5.21.



**Figura 5.21:** Gráfico da Análise dos Resíduos.

O histograma dos resíduos, em concordância com o teste de Anderson-Darling, afirma que os resíduos seguem uma distribuição normal, sendo o peso das caudas menores que do centro. O gráfico de QQ-Plot mais o gráfico de resíduos *versus* valores ajustados indicam que não há presença de valores aberrantes ou *outliers*.

E por fim, o último gráfico de resíduos *versus* ordem de coleta, avalia a independência das observações, ou seja, se não há tendência no momento do preparo ou da análise. Para esta avaliação, faz-se necessário que os dados sejam analisados na ordem de preparo, para não comprometer a integridade do teste. Como os mesmos apresentam-se aleatórios em torno do eixo central, aceitou-se que as observações não seguem uma tendência, sendo, portanto independentes.

#### 5.5.1.2 Avaliação de pontos influentes

Um ponto é denominado de influente se a sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial na análise de regressão (nos valores

ajustados ou nas estimativas dos coeficientes do modelo). Ocasionalmente algumas observações exercem grande influência na determinação dos coeficientes de regressão do modelo e tais observações são as denominadas observações influentes [69].

Um ponto influente não é necessariamente um *outlier*. A detecção de observações atípicas deve ser considerada simultaneamente com a detecção das observações que exercem grande influência na determinação dos coeficientes de regressão do modelo. Por isso, técnicas foram desenvolvidas para identificar essas observações influentes, sendo elas a distância de COOK, DFBETA e DFFITS. A fórmula de cálculo e aos critérios análise dos pontos influentes estão apresentadas na TAB. 5.18. As especificações foram definidas considerando amostras grandes [69].

**Tabela 5.28:** Critérios avaliação de pontos influentes.

| Diagnóstico | Fórmula                    | Valor |
|-------------|----------------------------|-------|
| DFFITS      | $2^* \text{raiz}((p+1)/n)$ | 0,62  |
| DCOOK       | $4/n$                      | 0,19  |
| DFBETA      | $2/\text{raiz}(n)$         | 0,44  |

O DFBETA (TAB. 5.20) avalia a influência do ponto no coeficiente angular do modelo. O DFFITS (TAB. 5.21) avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de COOK (TAB. 5.22) avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto (FIG 5.23). Os pontos influentes detectados estão dispostos nas TAB. 5.19, 5.20 e 5.21.

**Tabela 5.39:** Pontos Influentes (DFBETA).

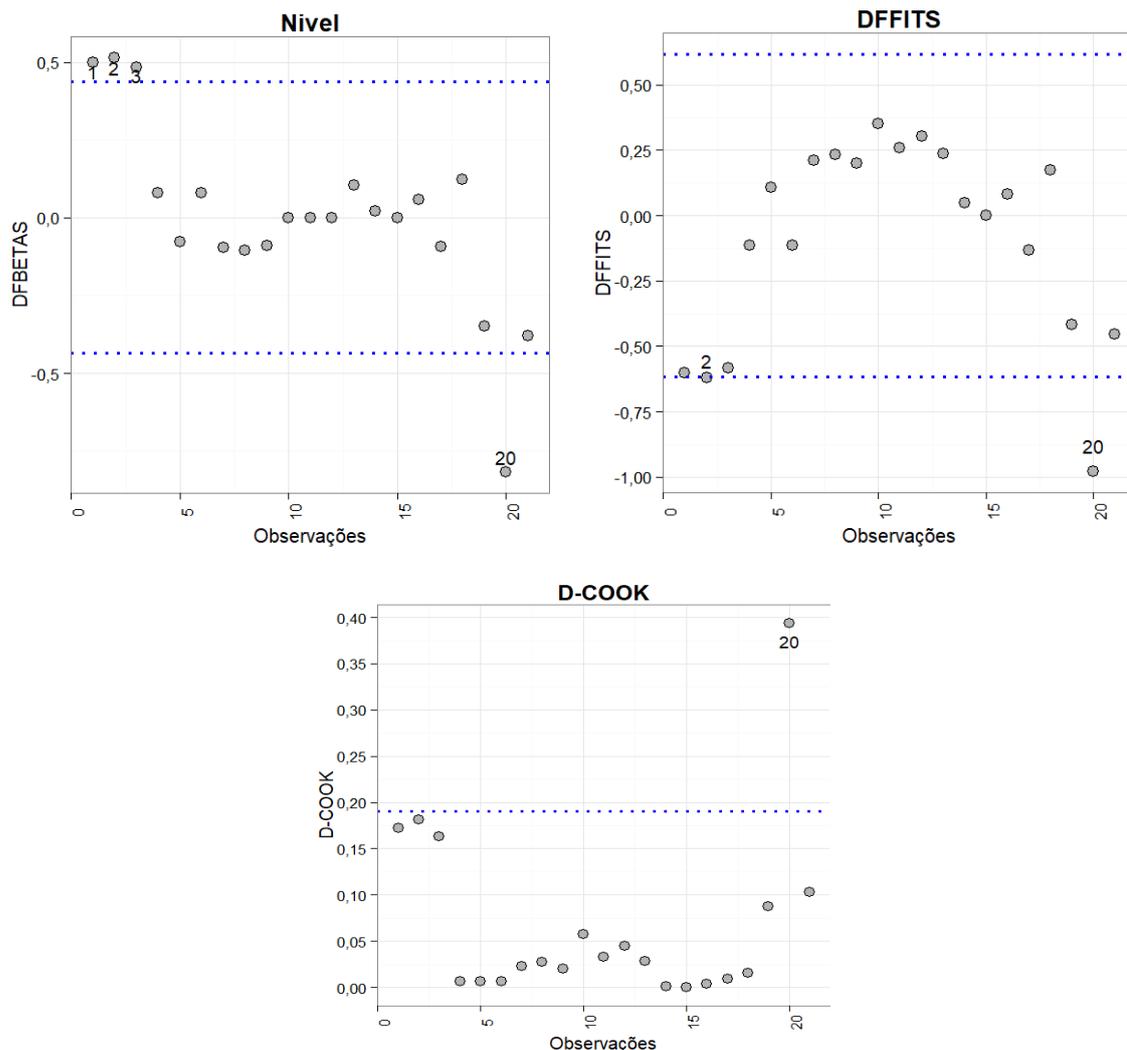
| Observações | DFBETA  | Critério |
|-------------|---------|----------|
| 1           | 0,5002  | 0,4364   |
| 2           | 0,5144  | 0,4364   |
| 3           | 0,4853  | 0,4364   |
| 20          | -0,8175 | 0,4364   |

**Tabela 5.40:** Pontos Influentes (DFFIT).

| Observações | DFFITS | Critério   |
|-------------|--------|------------|
| 2           | -0,62  | $\pm 0.62$ |
| 20          | -0,98  | $\pm 0.62$ |

**Tabela 5.51:** Pontos Influentes (DCOOK).

| Observações | DCOOK  | Critério |
|-------------|--------|----------|
| 20          | 0,3936 | 0,1905   |



**Figura 5.32:** Avaliação de pontos influentes.

O ponto 20 foi influente no coeficiente angular, no ajuste da curva e alavanca. O ponto 2 foi detectado como influente no coeficiente angular e no ajuste da curva. Os pontos 1 e 3 foram detectados como influentes no coeficiente angular.

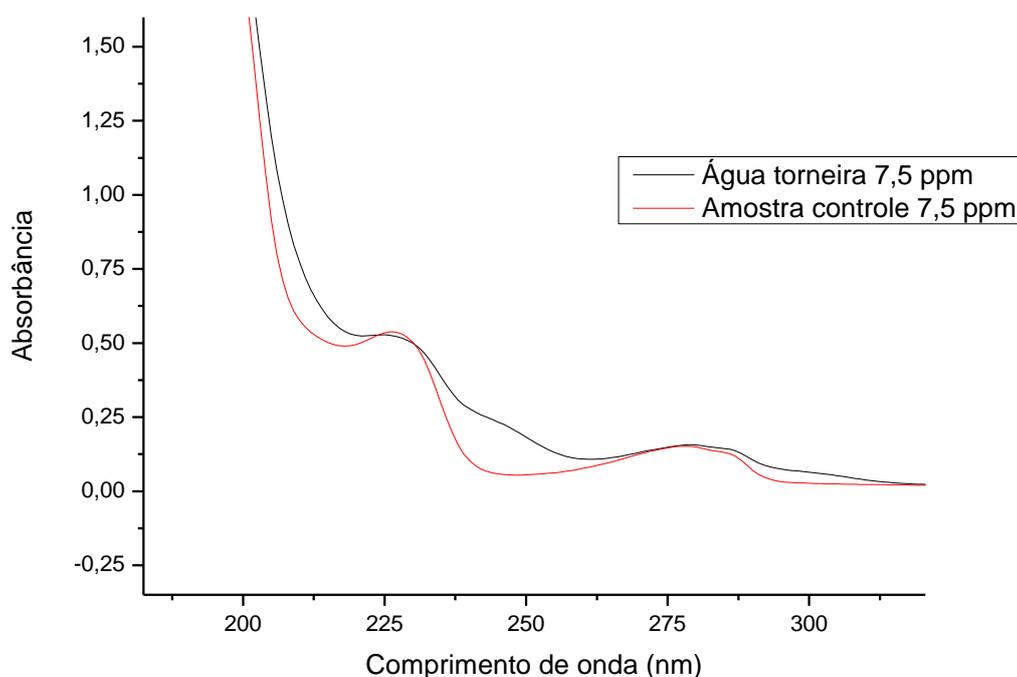
### 5.5.2 – Seletividade e efeito matriz

A utilização da fluorescência apresenta vantagens em relação a outros métodos pelo fato da mesma ser muito seletiva, tendo em vista que não são todas as moléculas que apresentam fotoluminescência, devido ao que acontece na maioria das moléculas, que é a liberação da maior parte da energia de seu estado excitado sob a forma de calor para seu entorno, ao invés da forma de luz [71].

Segundo o capítulo geral da Farmacopeia Americana (*USP 41*), na quantificação da fluorescência, a especificidade ou seletividade do método é assegurada pela falta de interferência de outros componentes presentes na matriz do analito [72].

Portanto, uma das maneiras de se avaliar a seletividade do método fluorimétrico em questão, é examinar quais componentes presentes na matriz de estudo poderiam interferir na fotoluminescência. Para realizar tal avaliação, a água de torneira foi escolhida, pois a mesma pode apresentar muitos interferentes. Sendo assim, a água de torneira foi contaminada com quantidades conhecidas do analito e avaliada a recuperação deste analito na presença desta matriz complexa. A ausência dos interferentes da matriz garantiriam a recuperação do analito e, portanto, a seletividade do método.

Portanto, a água de torneira foi contaminada com uma solução padrão de BFA de forma que a concentração final na solução fosse de 7,5 ppm. A concentração da  $\beta$ CD foi fixada no seu limite de solubilidade. Uma amostra controle (sem a presença da matriz) também foi realizada. Destas soluções foram realizadas as leituras no espectrofotômetro e no espectrofluorímetro, e os espectros são apresentados nas FIG. 5.23 e FIG. 5.24, respectivamente.



**Figura 5.43:** Espectro UV-Vis da água de torneira contaminada para avaliação da seletividade.

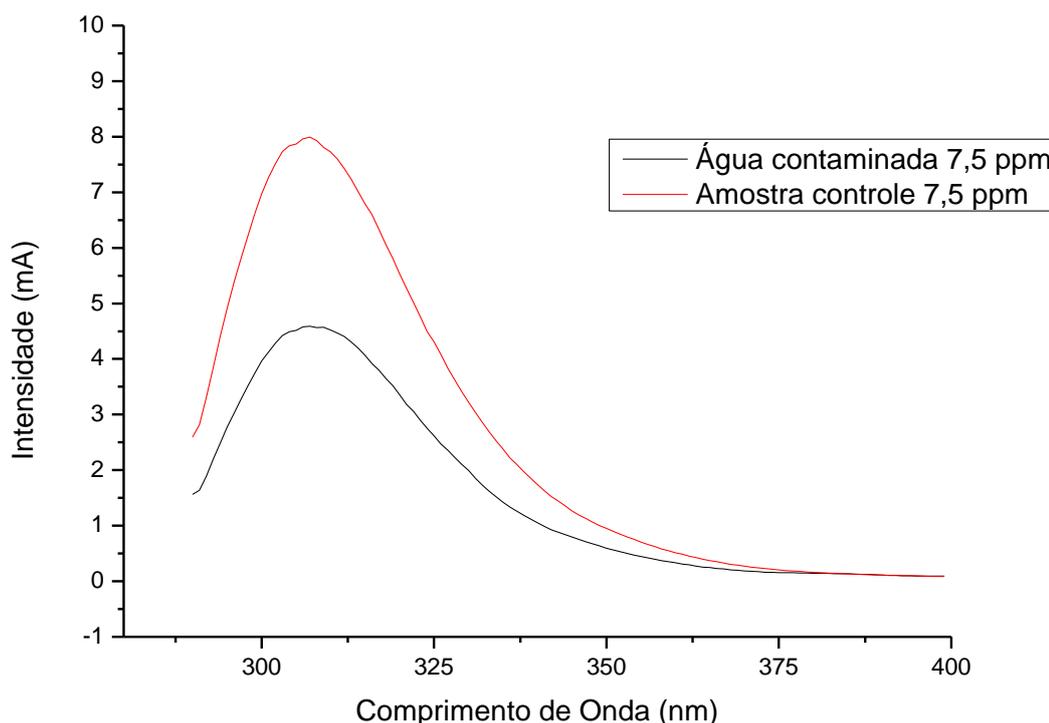
Pela avaliação qualitativa dos espectros das soluções na região do UV-Vis verifica-se que algum composto apresentou absorção em aproximadamente 250 nm. Sendo assim, não foi garantida a pureza espectral para o método por espectroscopia no UV-Vis tendo em vista que algum composto apresentou absorção na região de absorção do BFA.

Porém a avaliação quantitativa mostrou que tal composto não alterou os máximos de absorção do BFA, como apresentando na TAB. 5.22.

**Tabela 5.62:** Avaliação quantitativa da seletividade no UV-Vis.

| Amostra          | Abs à 278 nm | Abs à 226 nm |
|------------------|--------------|--------------|
| Água contaminada | 0,156        | 0,530        |
| Amostra controle | 0,152        | 0,538        |

Os espectros de emissão destas soluções estão apresentados na FIG. 5.24.



**Figura 5.54:** Sobreposição dos espectros de emissão da água de torneira contaminada para análise da seletividade.

A análise qualitativa dos espectros de emissão mostrou que não houve nenhum outro espectro de emissão que fosse sobreponível ao do BFA, indicando que o único espectro foi específico do analito de interesse. Portanto, o método

apresentou-se seletivo para identificação de BFA em uma matriz complexa de água, apresentando, portanto, pureza espectral. Porém a análise quantitativa mostrou interferência dos componentes da matriz, que fez com que a intensidade da fluorescência diminuísse e conseqüentemente baixa recuperação do BFA. A amostra controle apresentou recuperação adequada (dentro dos critérios da exatidão), como apresentado na TAB. 5.23.

**Tabela 5.73:** Avaliação quantitativa da seletividade na fluorescência.

| Amostra          | Intensidade Fluorescência | Rec (%) |
|------------------|---------------------------|---------|
|                  | 307 nm                    |         |
| Água contaminada | 4,592                     | 48,35   |
| Amostra controle | 7,991                     | 104,45  |

Alguns compostos tem a capacidade de promover a diminuição do sinal da fluorescência. São os chamados *quencher*s, ou a supressão da fluorescência que se refere a qualquer processo que produza uma diminuição na intensidade da fluorescência emitida por uma determinada substância. Este efeito pode ser definido como uma transferência de energia da molécula excitada, por processos não radiativos, para outras espécies químicas, ditas agentes desativadores, fazendo com que uma parte de moléculas fluorescentes, proporcional à população desses agentes desativadores, passem para o estado fundamental, diminuindo o rendimento quântico. O *quencher*s é um processo colisional, e por isso, requer o contato entre as espécies envolvidas. Em conseqüência, a magnitude dessa desativação é função da concentração dos agentes desativadores e da sua capacidade de difusão no meio. Os íons de oxigênio, iodeto e cloretos moleculares são desativadores químicos muito frequentes [71].

Como foi visto no planejamento experimental, a variável C (força iônica), não apresentou efeito significativo na resposta fluorescência. Para avaliação da força iônica, foi utilizado uma solução de NaCl de 0 a 0,068 mol.L<sup>-1</sup>. Por conta disto, concluiu-se que o cloro não era um interferente da matriz.

Poderiam ser vários os compostos interferentes, até mesmo compostos orgânicos presentes na água que ocasionaram efeitos de filtro interno, ou seja, parte da energia de excitação no fluorímetro pode ter sido absorvida por algum composto orgânico, fazendo com que o rendimento quântico diminuísse (geralmente ocorre

para compostos com absorção maior que 0,3), e conseqüentemente, a energia de excitação não foi suficiente para excitar toda molécula de BFA.

Portanto, verifica-se que o efeito da matriz é muito impactante na exatidão do método. Sendo assim, faz-se necessário realizar um estudo prévio dos efeitos da matriz na recuperação do BFA antes da utilização do método em questão, para garantir que a concentração encontrada seja a concentração real na amostra. Cada matriz, mesmo a água, apresenta componentes e interferentes diferentes que necessitam ser avaliados antes da quantificação do BFA. Assim, fica a sugestão, para futuros trabalhos, uma avaliação dos efeitos das diferentes matrizes para quantificação do BFA por espectroscopia de fluorescência.

### 5.5.3 – Exatidão

A exatidão é definida pelo grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. É expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou, pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela equação 7:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

No caso de impurezas, a avaliação da exatidão é realizada pela aplicação do método de adição de padrão, no qual quantidades conhecidas de impurezas ou produtos de degradação são acrescentadas à amostra e avaliada a recuperação do método. Na indisponibilidade de certas impurezas ou produtos de degradação, a exatidão pode ser realizada pela comparação dos resultados obtidos com um segundo método validado. Quando a exatidão é determinada a partir de um método anteriormente validado, deve-se considerar em substituição ao termo “concentração teórica” da equação 7, por concentração do analito determinada por meio desse [53].

Deste modo, a exatidão do método em questão foi verificada em duas situações: Pelo método de adição padrão e avaliação da recuperação do analito, e também, pela comparação com um segundo método, no caso, a metodologia por UV-Vis.

A exatidão foi analisada por meio de 9 determinações, em 3 níveis de concentração (3 réplicas de cada nível), contemplando a faixa linear do método, sendo elas 7,5, 15,0 e 26,5 ppm. A TAB. 5.24 apresenta os ensaios de exatidão, referente às concentrações médias experimentais determinadas em cada método, e também, a recuperação do analito.

**Tabela 5.84:** Avaliação da exatidão do método analítico.

| [ ] <sup>teórica</sup> <sup>1</sup><br>(ppm) | [MTD 1] <sup>2</sup><br>(ppm) | [ MTD 2] <sup>3</sup><br>(ppm) | DPR <sup>4</sup><br>(%) | Rec [MTD 1] <sup>5</sup><br>(%) | Especificação<br>(Rec %) <sup>6</sup> |
|--|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 7,63   | 7,42                          | 6,89                           | 5,29                    | 97,31                           |                                       |
| 15,25  | 15,88                         | 15,12                          | 3,46                    | 104,12                          | 90-107                                |
| 26,69  | 25,66                         | 25,65                          | 0,02                    | 96,15                           |                                       |

<sup>1</sup> Concentração corrigida pela massa;

<sup>2</sup> MTD 1 – Concentração média experimental obtida no espectrofluorímetro;

<sup>3</sup> MTD 2 – Concentração média experimental obtida no espectrofotômetro;

<sup>4</sup> DPR das concentrações entre os métodos;

<sup>5</sup> Recuperação média obtida no espectrofluorímetro;

<sup>6</sup> Conforme recomendação para recuperação para fração de massa 10<sup>-4</sup> [67].

A recuperação do analito e a DPR entre as concentrações experimentais obtidas em ambos os métodos foi considerada satisfatória, tendo em vista os critérios de aceitação da exatidão recomendados para o nível de concentração do analito de interesse [67]. Sendo assim, o método foi considerado exato.

#### 5.5.4 – Precisão

A precisão refere-se à proximidade entre os resultados obtidos e é demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições, conforme a equação (8):

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{MD}} \quad \text{Equação (8)}$$

Em que:

DP - Desvio padrão das medições;

MD - Média das medições;

A precisão é verificada em dois momentos: Na repetibilidade e na reprodutibilidade. Ambas devem expressar a proximidade entre os resultados

obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. Devem contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade [53].

No trabalho em questão a precisão foi verificada pela avaliação da proximidade dos resultados obtidos na exatidão, comumente realizado para validação de impurezas. Normalmente, avalia-se a precisão na presença da matriz (onde vai quantificar o analito na prática), o que não foi possível no trabalho em questão, devido ao estudo que deve ser realizado dos efeitos de cada matriz que se deseja quantificar o BFA. Ou seja, faz-se necessário realizar primeiramente a eliminação dos interferentes da matriz, como apresentado no item da seletividade, para então avaliar a precisão na presença destes interferentes, só assim, a avaliação da precisão será mais acurada, assim como para a reprodutibilidade.

A avaliação da precisão – repetibilidade (na ausência da matriz), é apresentado na TAB. 5.25.

**Tabela 5.95:** Avaliação da repetibilidade do método analítico.

| [ ] <sub>teórica*</sub><br>(ppm) | [ ] <sub>experimental</sub><br>(ppm) | DPR<br>(%) | Especificação<br>(%)** |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------|------------------------|
| 7,63                             | 7,27                                 | 3,48       | 5,3                    |
|                                  | 7,72                                 |            |                        |
|                                  | 7,27                                 |            |                        |
| 15,25                            | 16,00                                | 0,78       | 5,3                    |
|                                  | 15,75                                |            |                        |
|                                  | 15,88                                |            |                        |
| 26,69                            | 25,90                                | 1,46       | 5,3                    |
|                                  | 25,23                                |            |                        |
|                                  | 25,85                                |            |                        |

\* Concentração corrigida pela massa;\*\* Conforme recomendação para repetibilidade para fração de massa  $10^{-4}$  [67].

Tendo em vista o atendimento dos critérios recomendados para o nível de concentração do analito, considera-se que o método atendeu a precisão – repetibilidade.

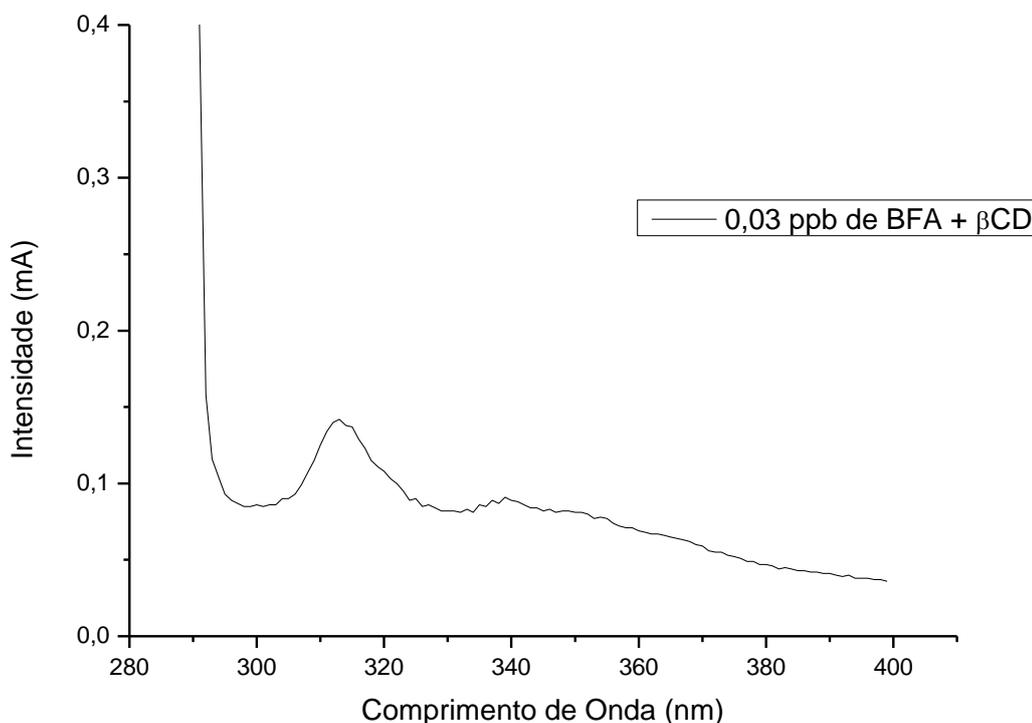
### 5.5.5 – Intervalo, limite de detecção e limite de quantificação

A faixa de trabalho do método analítico, ou o intervalo, foi de 3,75 a 26,25 ppm (faixa da linearidade), compreendendo a faixa de concentração de 0,00375 a 0,0265 mg.mL<sup>-1</sup> de BFA, sendo o intervalo onde a linearidade foi verificada.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim, o LQ do método em questão foi de 7,5 ppm ou 0,0075 mg.mL<sup>-1</sup> pois nesta concentração o método apresentou-se preciso e exato.

O limite de detecção (LD) é demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas [53].

Segundo esta definição, o LD do método é apresentado na FIG. 5.25 (utilizando a  $\beta$ CD no limite de solubilidade), onde foi verificado sinal do analito, sem interferência de ruídos, em uma concentração muito baixa, de 0,03 ppb ou  $3 \times 10^{-8}$  mg.mL<sup>-1</sup> de BFA.



**Figura 5.65:** Avaliação do limite de detecção.

Mais ajustes nos parâmetros do equipamento como a abertura de fenda, poderiam aumentar a intensidade da resposta e promover a diminuição do ruído, aumentando conseqüentemente o LD. Porém, o LD foi testado nas condições normais do método.

Uma das formas de se determinar o limite de detecção para métodos instrumentais é pela razão sinal-ruído, que deve ser maior ou igual a 2:1 [53]. Assim, foi empregado soluções diluídas até se obter um sinal referente ao analito com uma área média igual a duas vezes e meio o sinal referente ao ruído para o LD. Portanto, o sinal-ruído obtido para o LD testado foi de 2,5:1, como apresentado na TAB. 5.26, confirmando, portanto que o LD do método foi de 0,03 ppb.

**Tabela 5.106:** Avaliação do sinal/ruído.

|                   | Intensidade Fluorescência<br>(mA) |
|-------------------|-----------------------------------|
| Área do analito   | 2,56                              |
| Área do ruído     | 1,03                              |
| Razão sinal/ruído | 2,48                              |

Este baixo LD só foi possível devido à incorporação da  $\beta$ CD no processo, que promoveu maior rigidez molecular para o BFA por meio do encapsulamento, e conseqüentemente, maior intensidade de fluorescência.

#### **5.5.6 – Robustez**

A robustez é um parâmetro realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas [53]. Portanto, a avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento, não apenas em validação e deve mostrar a confiabilidade de uma análise com relação a variações deliberadas nos parâmetros do método [73].

Para o caso da fluorescência, estas variações deliberadas podem incluir variação de pH, remoção do oxigênio ou contaminação da amostra com interferentes por meio de um designer de experimentos [72]. Sob esta ótica, a robustez da metodologia analítica em questão já foi verificada no estudo multivariado, onde,

avaliou-se a resposta do método frente às deliberações nas variáveis pH, temperatura e força iônica.

Deste modo, o método apresentou-se robusto as deliberações de temperatura e força iônica, pois estas variáveis, dentro da faixa de estudo, não apresentaram efeitos significativos na resposta. Sendo assim, pode-se trabalhar com qualquer valor destas variáveis, dentro da faixa de estudo do planejamento, sem que ocorram alterações significativas na resposta, o que significa que o método se apresentou robusto para as alterações destas variáveis. Porém, as análises experimentais demonstraram que menores temperaturas proporcionam melhores condições de operação. Sendo assim, menores temperaturas (-1,68 e -1, valores codificados), são de interesse.

No caso do pH, há uma região ótima para a resposta fluorescência, sem que a resposta fique prejudicada, que ocorre quando a variável pH se encontra na faixa de -1 a +1 (valores codificados). Portanto, deliberações das variáveis pH na faixa de 5,0 a 6,0 garantem a robustez do método, pois nestas faixas de deliberações não há diferença significativa na resposta do método.

#### **5.5.7 – Estabilidade das soluções**

Em relação à estabilidade do complexo de BFA +  $\beta$ CD, verificou-se que as amostras se mantiveram estáveis por mais de 72h em solução na geladeira. Não foi verificada a estabilidade das soluções mantidas fora da temperatura de refrigeração.

#### **5.5.8 – Observações**

A vantagem do método em questão em relação a outras técnicas comumente utilizadas para quantificação de BFA é que a propagação do erro apresenta-se menor pelo fato de uma etapa ser eliminada neste processo, que é a derivatização do BFA para quantificação, como feito para metodologias por CG e para algumas por HPLC [12], pois a espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito sensível e a incorporação da  $\beta$ CD proporcionou ainda mais o aumento dos limites de detecção e trabalhar em faixas muito diluídas do analito de interesse sem interferência de ruído.

Dependendo da matriz que se deseja quantificar o BFA, não teria como excluir a etapa de tratamento da amostra como a extração por solventes ou extração em fase sólida, como é o caso de amostra de alimentos, sangue, leite e urina humana [12]. Porém, numa matriz aquosa (água potável, mineral, etc), como visto no trabalho em questão, talvez alguns complexantes já seriam suficientes, o que excluiria mais uma etapa que poderia aumentar a propagação de erros (a avaliação dos interferentes da matriz será específico para cada amostra que se deseja quantificar o BFA).

## 6.0 – CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 – CONCLUSÃO

O uso da  $\beta$ CD visando aumento na resposta de intensidade de fluorescência do BFA foi possível devido a ocorrência do encapsulamento molecular que proporcionou maior rigidez para a molécula de BFA, e conseqüentemente, aumento da resposta do sinal, o qual permitiu o uso de baixo limite de detecção (0,03 ppb) e de quantificação (7,5 ppm) da metodologia proposta sem interferências de ruído ou sinal analítico prejudicado.

A validação do método analítico seguindo as recomendações da ANVISA foi considerada satisfatória, pois a linearidade obtida da curva analítica foi excelente, apresentando um coeficiente de correlação entre as variáveis de 0,996 e ajuste de modelo adequado, por meio da avaliação dos resíduos.

O método proposto foi considerado seletivo tendo em vista que nenhum outro espectro se sobrepôs ao espectro do BFA, quando eliminado os interferentes da matriz. Foi considerado preciso e exato, haja vista as recuperações terem-se encontrado dentro da faixa de 96 – 107% e o maior valor de DPR de 3,5%, terem sido bem inferiores aos recomendados pela literatura. O planejamento experimental representou a robustez do método, indicando que há uma faixa ideal de temperatura e pH para se trabalhar e não haver variações analíticas.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que a metodologia proposta pode ser utilizada em análises de monitoramento de BFA em águas, com alto grau de confiabilidade.

### 6.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para quantificação de BFA em água pelo método desenvolvido, faz-se necessário, para a complementação do método, realizar um estudo de *clean up* da amostra, ou seja, a eliminação dos interferentes ou os chamados desativadores da fluorescência para garantir que o BFA quantificado seja exatamente a quantidade que se encontra na matriz. Ou seja, para cada amostra analisada, um estudo prévio dos efeitos da matriz na recuperação do analito deve ser realizado.

## 7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Beserra MR, Schiavini JA, Rodrigues WC, Pereira CSQ. O bisfenol A: Sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *TECCEN*. 2012; 5:37-46.
- [2] Maia J, Cruz JM, Sedón R, Bustos J, Sanchez JJ, Peseiro P. Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International*. 2009; 42:1410 – 1414.
- [3] Wu X, Wang L, Ma W, Zhu Y, Xu L, Kuang H, Xu C. A simple, sensitive rapid and specific detection method for Bisphenol A based on fluorescence polarization immunoassay. *Immunological Investigations*. 2012; 41.
- [4] Lane RF, Adams CD, Randtke SJ, Carter Jr RE. Chlorination and chloramination of bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol A diglycidyl ether in drinking water. *Water research*. 2015; 79:68 – 78.
- [5] Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Perez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography*. 2009; 1216:449 – 469.
- [6] Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van-Looco J, Covac A. A review of dietary and non-dietary exposure to Bisphenol-A. *Food Chemical Toxicology*. 2012; 50:3725 – 3740.
- [7] Ghiselli G, Jardim WF. Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Quím. Nova*. 2007; 30:1678-7064.
- [8] Maroto A, Kissingou P, Diascorn A, Benmansour B, Deschamps L, Stephan L, Cabon JY, Giamarchi P. Direct laser photo-induced fluorescence determination of bisphenol A. *Analytical Bioanalytical and Chemistry*. 2011; 401:3011–3017.
- [9] Yoon Y, Westerhoff P, Snyder SA, Esparza M. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 $\beta$ -estradiol, and 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Research*. 2003; 37:3530 – 3537.
- [10] Matta MHR, Pereira AL, Montagner E, Fortunato GV. Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2012; 71:624-629.
- [11] Luttrell WE, Baird BA. Bisphenol A. *Journal of Chemical Health & Safety*. 2014; 21:1871 – 5532.
- [12] CÃO XL. A Review recent development on analytical methods for determination of bisphenol a in food and biological samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2012; 35:2795–2829.
- [13] Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: An Estrogenic Substance is Released from Polycarbonate Flasks During Autoclaving. *Endocrinology*. 1993; 132:2279–2286.
- [14] Otaka H, Yasuhara A, Morita M. Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction. *Analytical Sciences*. 2003; 19:1663 – 1666.
- [15] Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*. 2004; 18:501 – 507.
- [16] Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usukic Y, Nozawaa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*. 2007; 66:1160–1164.

- [17] Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo K. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1999; 736:255–261.
- [18] Brock JW, Yoshimura Y, Barr JR, Maggio VL, Graiser SR, Nakazawa H, Needham LL. Measurement of bisphenol A levels in human urine. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 2011; 11:323 – 328.
- [19] Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*. 2002; 68:121 – 146.
- [20] Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, et al. Bisphenol A Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Current Biology*. 2003; 13:546–553.
- [21] Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty RJS, et al. Gestational Exposure to Bisphenol A Produces Transgenerational Changes in Behaviors and Gene Expression. *Endocrinology*. 2012; 153:3828-3838.
- [22] Cox K, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav*. 2010; 58:754-61.
- [23] Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa, H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000; 749:17–23.
- [24] Sieli PT, Jašarević E, Warzak DA, et al. Comparison of Serum Bisphenol A Concentrations in Mice Exposed to Bisphenol A through the Diet versus Oral Bolus Exposure. *Environ Health Perspect*. 2011; 119:1260-1265.
- [25] Viñas P, López-Gracia I, Campillo N, Rivas RE, Hernández-Córdoba M. Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry using the Taguchi design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404:671–678.
- [26] Errico S, Bianco M, Mita L, et al. *Food Chemistry*. 2014; 160:157 – 164.
- [27] Nam SH, Seo YM, Kim MG. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 2010; 79:949 – 952.
- [28] Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer Of Bisphenol A From Thermal Printer Paper To The Skin. *ANAL BIOANAL CHEM*. 2010; 398: 571–576.
- [29] Stump DG, Beck MJ, Radovsky A, et al. Developmental Neurotoxicity Study of Dietary Bisphenol A in Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*. 2010; 115: 167-182.
- [30] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Embalagem de alimentos II. Brasília/DF, 22 de junho de 2016.
- [31] FDA – U.S Food & Drug administration. Questions & Answers on Bisphenol A (BPA) Use in Food Contact Applications. May 2, 2016.
- [32] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 41, de 14 de setembro de 2011 – Proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes.
- [33] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Perguntas e respostas sobre materiais em contato com alimentos. Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia para Alegações (GEARE), Gerência Geral de Alimentos (GGALI). Brasília/DF, 10 de novembro de 2014, v.1.
- [34] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012 – Lista positiva de monômeros,

outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

[35] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 17, de 17 de março de 2008 – Regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos com contato com alimentos.

[36] BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília (DF); 16 maio 2011.

[37] Moreira AB, Oliveira HPM, Atvars TDZ, et al. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 539:257–261.

[38] Góes-Filho, L. S. Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica - PUC-Rio, Curso de Física; 2005.

[39] Coelho AL, Aucélio RQ. Photochemical Induced Fluorescence for the Determination of Prednisolone and Triamcinolone. *Analytical Letters*. 2006; 39:619–630.

[40] Marques FFC, Souza CF, Figueiredo FS, Aucélio RQ. Selective Determination of Harmol by Room-Temperature Phosphorimetry: A Comparative Performance with Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Analytical Letters*. 2008; 41:1648–1657.

[41] Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Ed. Plenum Press, New York and London, vol.4, p.501, 1994.

[42] Rangel HA, Merçon F. Estudo da emissão por fluorescência de ultravioleta na quantificação de um inibidor de corrosão do tipo sal de amônio quaternário em água. *Quím. Nova*. 2012; 35:1287-1293.

[43] Galea LAM, Barha CK. Maternal bisphenol A (BPA) decreases attractiveness of male offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:11305– 11306.

[44] Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, et al. Measurement of Bisphenol A Levels in Human Blood Serum and Ascitic Fluid by HPLC Using a Fluorescent Labeling Reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 30:1743–1749.

[45] Watanabe T, Yamamoto H, Inoue K, et al. Development of Sensitive High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)-benzoyl Chloride as a Labeling Reagent for Determination of Bisphenol A in Plasma Samples. *J. Chromatogr. B*. 2001; 762:1–7.

[46] Guedes FL, Alves GMC, Santos FLA, Lima LF, Rolim LA, Neto PJR. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev. Bras. Farm.* 2008; 89:220 – 225.

[47] Britto MAFO, Nascimento Jr CS, Santos HF. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Química Nova*. 2004; 27:1678-7064.

[48] PORTAL DOS FÁRMACOS. Resenhas - Ciclodextrinas como veículos para administração de fármacos, Rio de Janeiro, 2007.

[49] Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004; 39:1033–1046.

[50] Schneiderman E, Stalcup AM. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B*. 2000; 745:83–102.

- [50] Wang H, Li C, Gao M, et al. Effects of room temperature ionic liquids on fluorescence properties of bisphenol A in  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*. 2014; 200:374-380.
- [51] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*. 1998; 98:1743–1753.
- [52] MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes – Padronização, Preparação e Purificação. 2ª edição. Editora Edgard Bucher LTDA.
- [53] BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 166, de 25 de julho de 2017 – Validação de métodos analíticos.
- [54] Yang Z, Chen Y, Liu Y. Inclusion complexes of bisphenol A with cyclomaltoheptaose ( $\beta$ -cyclodextrin): solubilization and structure. *Carbohydrate Research*. 2008; 343:2439-2442.
- [55] Martins CR, Lopes WA, Andrade JB. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*. 2013; 36:1248 – 1255.
- [56] Cunha-Filho MSS, Sá-Barreto, LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2007; 28:1-9.
- [57] GRILLO R, MELO NFS, FRACETO LF. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Quim. Nova*. 2008; 31:290-295.
- [58] Ansolin TL, Bariccatti RA, Rosa MF, LINDINO CA. The effect of  $\beta$ -Ciclodextrina in the photochemical stability of propanolol hydrochloride in aqueous solution. *Acta Scientiarum Technology*. 2014; 36:337-340.
- [59] Sabadine E, Cosgrove T, Egídeo FC. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O: a comparative study. *Carbohydrate Research*. 2006; 341:270–274.
- [60] Olmo MD, Zafra A, Gonzalez-Casado A, Vilchez JL. The Use of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes for the Analysis of Bisphenol a Residues in Water by Spectrofluorimetry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2006; 69:99-110.
- [61] Munguia-Lopez EM, Peralta E, Gonzalez-leon A, Vargas-Requena C, Soto-Valdez H. Migration of Bisphenol A (BPA) from Epoxy Can Coatings to Jalapeno Peppers and an Acid Food Simulant. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50:7299–7302.
- [62] SOUZA, R. Espectrofotometria no UV-Vis e fluorescência molecular. *Analítica avançada*, 2011. Universidade Federal Juiz de Fora (UFJF), 2011.
- [63] SCHULMAN, S.G. Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice. 1ª ed. New York: Pergamon Press, 1977.
- [64] Fonte: Chemicalize. <https://chemicalize.com/#/calculation>.
- [65] INGLE, J.D., CROUCH, S.R. Spectrochemical analysis. 1a ed. New Jersey: Prentice Hall, 1988.
- [66] Wang G, Wu F, Zhang X, Luo M, Deng N. Enhanced TiO<sub>2</sub> photocatalytic degradation of bisphenol A by  $\beta$ -ciclodextrin in suspended solutions. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*. 2006;179:49-56.
- [67] AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F, p. 9.
- [68] RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

- [69] Portal Action. Estatcamp - Consultoria Estatística e Qualidade, por DIGUP - Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística. Disponível em:<  
<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em jul. de 2018.
- [70] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Guia para tratamento estatístico da validação analítica nº 10/2017, versão 1.
- [71] De Oliveira DM, Novaes CG, Silva Junior LJC, Pereira RS, Bezerra MA. Desenvolvimento de um Fluorímetro Artesanal e Propostas para sua Aplicação nas Aulas Práticas de Disciplinas de Química Analítica Instrumental nos Cursos de Graduação. Rev. Virtual Quim. 2015; 7:2438-2456.
- [72] United States Pharmacopeia – USP 41.
- [73] International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH - harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Current Step 4 version. Parent Guideline dated 27 October 1994. (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).