

2.

Introdução

2.1

Alcaloides da classe das β -carbolinas

2.1.1

Informações gerais

Norharmine, harmine, harmine, harmol, harmalol e harmaline (ver estruturas na Figura 1) são alcaloides da classe das β -carbolinas (9H-pirido[3,4-b]indol). Esses alcalóides possuem em sua estrutura um grupo indol e um anel piridínico adjacentes e têm diferentes graus de aromaticidade.

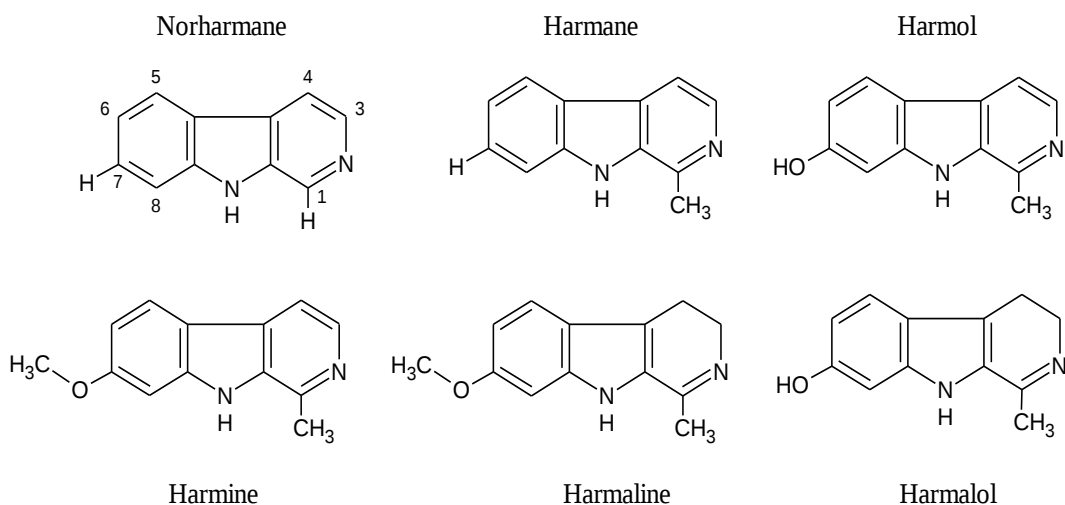


Figura 1. Estruturas químicas das β -carbolinas.

Para estruturas policíclicas orgânicas é comum, além da nomenclatura oficial da IUPAC, a utilização de nomenclatura trivial. Para os alcaloides estudados neste trabalho, os nomes oficiais e as siglas adotadas para eles ao longo desse texto se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Siglas e nomenclaturas das β -carbolinas:

Substância	Sigla	Nomenclatura oficial	Nomenclatura usual
Norharmane	NOR	9H-pirido[3,4-b]indol	β -carbolina
Harmane	HAE	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol	1-metil- β -carbolina
Harmine	HIE	7-metoxi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol	7-metoxi-1-metil- β -carbolina
Harmol	HOL	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol	7-hidroxi-1-metil- β -carbolina
Harmalol	HLOL	1-metil, 3H, 4H, 9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol	3,4-dihidro-7-hidroxi-1-metil- β -carbolina
Harmaline	HLIN	7-metoxi-1-metil-3H, 4H, 9H-pirido [3,4-b]indol	3,4-dihidro-7-metoxi-1-metil- β -carbolina

Estudos mostraram que as β -carbolinas provocam diversas atividades fisiológicas que variam em tipo e intensidade em função do alcaloide. Entre essas se destacam as atividades hipotensiva, temorgênica e cardiovascular (Martin, 2005). Os efeitos estimulatórios são decorrentes da ligação com receptores benzodiazepinas (Tsuchiya et al., 1999) e, além disso, elas são inibidoras da ação da monoamina oxidase (Thomas-Vert et al., 1983; Tsuchiya et al., 1999). Estudos indicaram que as β -carbolinas têm ação antileishmanial e antimicrobiana (Rodriguez et al., 1982). Efeitos como neuropsicoatividade e alucinação (Gunn, 1937) também são conhecidos. Quando em concentrações mais elevadas, as β -carbolinas podem ser tóxicas, como exemplo, o valor de LD_{50}^1 de harmane, para camundongos, é igual a $50 \mu\text{g g}^{-1}$ do alcaloide, como reportado por Cordell (1993).

Estudos relacionaram a presença desses alcaloides, em níveis de concentração específicos, com diversos estados patológicos (Tsuchiya, 2004) tais como doença de Parkinson, tremores e câncer. De fato, um dos estudos relacionou a similaridade molecular do HAE com uma neurotoxina que induz a doença de Parkinson (Pfau e Skog, 2004). De fato, tremores característicos dessa doença foram observados após a administração dessa substância em ratos. Estudos

¹ LD_{50} é uma abreviação de *lethal dose 50%* que significa a dose média de uma dada substância necessária para matar metade de uma população testada em um tempo específico. LD_{50} é frequentemente usada como indicador da toxicidade aguda das substâncias.

também mostraram que indivíduos alcoólatras, tabagistas e viciados em algumas drogas ilícitas apresentam níveis mais elevados de algumas das β -carbolinas.

As β -carbolinas ocorrem naturalmente em mamíferos em decorrência principalmente da reação de condensação de Pictet-Spengler (Tsuchiya, 2004). Nesta reação, as indolaminas (triptaminas, serotonina e triptofano) reagem com substâncias carbolínicas (formaldeído, acetaldeído) resultando em β -carbolinas de estruturas diversas, como pode ser observado na representação da Figura 2 (Nishigata et al., 1980; Moncrieff, 1989; Brossi, 1993; Tsuchiya et al., 1999). O uso excessivo ou a intoxicação por álcool pode aumentar a presença de acetaldeído no sangue, aumentando a possibilidade de formação de triptolinas que, por oxidação *in vivo*, podem formar a NOR e HAE que aparecem no plasma sanguíneo, urina e plaquetas de humanos (Moncrieff, 1989; Pfau e Skog, 2004). Desta forma, essas β -carbolinas podem ser potenciais biomarcadores em alcoólatras, fumantes e viciados em heroína (Pfau e Skog, 2004).

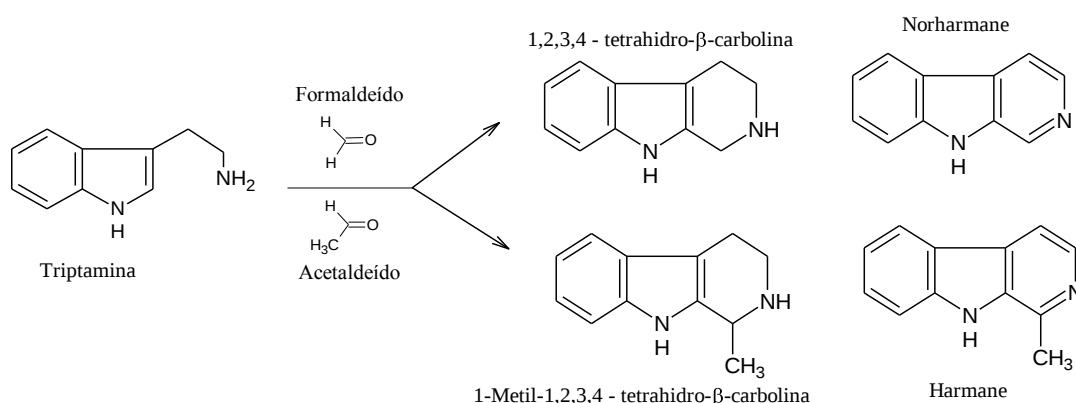


Figura 2. Condensação de triptamina formando algumas β -carbolinas (adaptado de Tsuchiya, 2004).

Segundo Guan e colaboradores (2001), o HIE foi formado no organismo de ratos após a administração oral de uma dose de HAE (20 mg kg^{-1} de peso corporal). A quantidade de HIE formada correspondeu a 13% da dose administrada após 26 minutos. Esse aparecimento de HIE no sangue após a sua administração oral sugere que o HAE sofre uma biotransformação hepática antes de entrar na circulação sanguínea. Baseando-se neste e em outros estudos, uma rota metabólica destas substâncias foi sugerida, como mostrado na Figura 3.

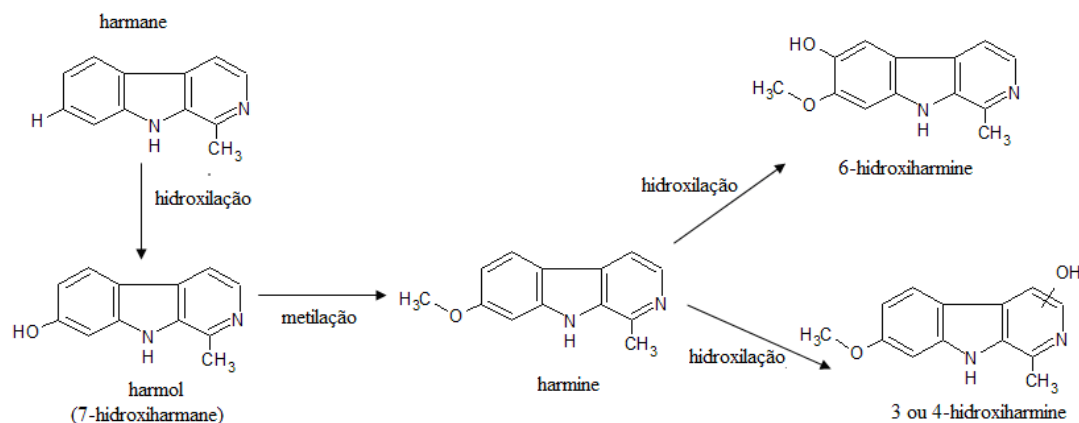


Figura 3. Proposta de via metabólica para harmone e harmine (adaptado de Guan, 2001).

O HAE, uma vez absorvido pelo corpo, sofre uma primeira etapa do metabolismo pelo citocromo P450 no fígado, produzindo o metabólito 7-hidroxi-harmone (HOL), o qual é metilado para gerar o HIE. Uma porção deste HIE entra na circulação sanguínea, enquanto que outra porção é hidroxilada pela enzima P450 ou eliminada na bÍlis. Uma vez que a metilação do 7-hidroxi-harmone aumenta a lipofilicidade do alcaloide, o HIE pode ser mais favoravelmente distribuído pelos tecidos do corpo (Guan et al., 2001). Em estudos recentes foram identificados 21 metabólitos provenientes da ingestão de harmone na bÍlis, urina, fezes e plasma de ratos e *in vitro* (Li et al., 2014). A obtenção desse resultado foi possível pelo uso da cromatografia líquida de alta resolução (RRLC ou UPLC) com detecção por espectrometria de massa (MS) em um espectrômetro combinado quadrupolo-tempo de vôo (QTOF). As vias metabólicas do HAE incluem mono-hidroxilação e dihidroxilação, além de outras rotas como a *N*-oxidação, *O*-conjugação glucoronídeo e que levam à formação de diversos derivados como constatado no estudo citado. Um dos metabólitos detectados foi o HOL e, contraditoriamente, o HIE não foi identificado (Li, 2014), divergindo dos resultados obtidos por Guan et al. (2001). Segundo Li e colaboradores essa discrepância pode ter sido causado por falhas na separação e/ou identificação do HIE. Estudos revelaram, ainda, que HIE e HLINE podem sofrer *O*-desmetilação, *in vivo* e *in vitro*, produzindo HOL, HLOL e seus metabólitos, respectivamente (Riba et al., 2012; Zhang et al., 2013).

No corpo humano, qualquer alcaloide β -carbolina encontrado em um tecido do cérebro é produto de uma reação endógena (Moncrieff, 1989), ao passo

que a presença dessas substâncias em outras partes do organismo é proveniente de fontes exógenas, como alimentos ou exposição ao ambiente contaminado com essas substâncias como fumaça de combustão de material rico em proteínas. A quantidade de β -carbolinas em alimentos depende da temperatura e do tempo de exposição do mesmo ao calor (Adachi et al., 1991; Gross e Griiter, 1992). Como exemplo de alimentos que contém esses alcaloides pode se citar os chás (Nishigata et al., 1980), vinhos, cervejas, uísque, saquê (Zheng et al., 2000). As carnes bovinas e peixes, que são alimentos ricos de triptofano, podem ter β -carbolinas na ordem de ng g^{-1} (Casal et al., 2004). As principais fontes de exposição ambiental às β -carbolinas são os resíduos decorrentes de queimadas acumulados nas águas de rios, na chuva e no próprio ar atmosférico (Kataoka, 1997), nas fumaças de cigarro e nos vapores provenientes do cozimento de alimentos (Nishigata et al., 1980).

Apesar da relevância das fontes citadas, as principais são os fitoterápicos dos extratos de raízes, folhas ou sementes de plantas de comprovada atividade medicinal. Neles foi possível encontrar o NOR e o HAE em concentrações de até 131 ng (NOR) e 99,5 ng (HAE) por grama de extrato seco de fitoterápico (Tsuchiya et al., 1999). Como exemplos de extratos de plantas ricos em alcaloides da classe das β -carbolinas podem ser citados a *Ayahuasca* (Yrita et al., 2002), a *Peganun harmala* (Kartal et al., 2003), a *Banisteria caapi*, a *Passiflora incarnata* (Rehwald et al., 1995; Tsuchiya et al., 1999; Grice et al., 2001), a *Tribulus terrestris*, a *Ginseng* e o gengibre (Tsuchiya et al., 1999). De fato, Tsuchiya et al. (1999) relacionaram a presença de β -carbolinas com os efeitos medicinais desses fitoterápicos, devido à sua neuroatividade e ação antimicrobiana.

A *Passiflora*, o gênero de plantas cujo extrato fitoterápico foi escolhido para o presente estudo, vem sendo utilizada com fins medicinais desde tempos remotos por causa de seus efeitos no combate à irritabilidade e insônia. Em especial, as folhas do maracujá (*Passiflora* da família *Passifloraceae*) é base de vários fitoterápicos que são hoje em dia autorizados para serem comercializados em função dos comprovados efeitos fisiológicos. Das 400 espécies de *Passiflora*, 30 são conhecidas por terem frutos comestíveis. Nos Estados Unidos, de onde é nativa, a *Passiflora incarnata* L. (conhecida como *wild passion flower* ou como maracujá vermelho) é muito cultivada. Por causa de suas propriedades sedativas e a presença de flavonóides (0,25%), de pequenas quantidade de glicosídeos

cianogênicos, traços de alcaloides β -carbolinas (0,1%), maltol e etilmaltol (0,05%), e ácidos clorogênicos, a planta tem sido recomendada, desde o início do século 20, para o tratamento da insônia e de sintomas da menopausa (Pereira e Vilegas, 2000). A *Passiflora incarnata* L. está descrita em várias Farmacopéias por causa de suas propriedades terapêuticas (Carlini, 2003).

No Brasil, as espécies mais conhecidas são a *Passiflora edulis* Sims (maracujá roxo) e seu derivado mais próximo, a *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener (maracujá amarelo) que é o mais cultivado em escala comercial. Em menor escala, as espécies *P. quadrangularis* L., *P. caerulea* L. e *P. laurifolia* L. são também comercializadas no país. A *Passiflora alata* Dryander, também conhecida como maracujá doce, foi eleita pela Farmacopéia Brasileira como a mais indicada para fins medicinais, apesar de ser pouco difundida (Pereira e Vilegas, 2000).

Conhecer a concentração de β -carbolinas nos fitoterápicos de *Passiflora* é relevante, pois ao mesmo tempo em que pequenas doses esses alcaloides atuam como estimulantes cerebrais, doses mais elevadas produzem efeitos alucinógenos e tóxicos (Léon et al., 2007). A farmacopeia Suíça exigia um teor mínimo de 0,01% de HAE em preparações de *Passiflora incarnata* para que seus extratos pudessem ser utilizados em tratamentos terapêuticos. No entanto, estudos mostraram, em testes com animais, que o HAE e a NOR potencializam a formação de tumores. Tal fato levou o Instituto de Saúde de Berlim e as Farmacopéias Suíça e a Francesa a limitarem a presença de HAE, NOR, HIE e HLINE nos fitoterápicos em valores abaixo de 0,01% (Instituto de Saúde de Berlim) ou $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (nas Farmacopéias citadas) para serem liberadas para consumo (Grice et al., 2001). Desta forma, a dosagem das β -carbolinas nos extratos vegetais e seus produtos se tornaram importante.

2.1.2

Descrição dos principais métodos cromatográficos para determinação de β -carbolinas

Muitos métodos baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido reportados na literatura, mas somente alguns foram

desenvolvidos para a determinação de mais de quatro β -carbolinas na mesma corrida cromatográfica. Adicionalmente, a grande maioria desses métodos utiliza fase móvel rica em acetonitrila (ACN) e/ou metanol, coluna com fase estacionária C18 e detecção óptica (fluorescência ou absorção molecular).

Tsuchiya et al. (1999) propuseram um método para determinação de quatro β -carbolinas (HOL, HAE, NOR e HIE) em *Passiflora incarnata* e *Tribulus terrestris*. Os extratos de plantas foram tratados com fluorescamina (agente de derivação) e submetidos a mais três extrações para permitir a limpeza de amostras antes da análise cromatográfica utilizando eluição isocrática (tempo de corrida menor de 18 minutos) com a fase móvel aquosa contendo 18% v/v de ACN. Valores de limite de detecção (LOD) na faixa de sub-ng mL⁻¹ permitiram a quantificação de, pelo menos, dois dos alcaloides nas amostras reais. Katral et al. (2003) desenvolveram um método para determinar HIE, HOL, HLINE e HLOL em sementes de *Pergamum harmala L.* A fase móvel utilizada foi um tampão (pH 8,6) contendo 40% (v/v) de solventes orgânicos (propan-2-ol e ACN). Os analitos foram extraídos das sementes com éter de petróleo, secos e redissolvido em metanol antes da introdução no sistema cromatográfico (tempo total de corrida menor que 12 minutos), seguido por detecção absorciométrica no UV (LOD de 3 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Abourashed et al. (2003) propuseram um método por HPLC para se obter uma impressão digital de várias amostras de *Passiflora incarnata*, baseada na detecção de cinco β -carbolinas. As amostras foram submetidas a um procedimento de extração complexo que incluía extração por fase sólida (SPE) em fase catiônica de tal forma a concentrar os analitos. O modo de eluição por gradiente, utilizando fase móvel tamponada (tampão acetato pH 4) contendo metanol (variando o metanol entre 25 e 55%) permitiu a separação dos alcaloides (HOL, HLOL, HAE, HIE e HLINE) em 20 minutos. Com o uso de detecção absorciométrica (LOD até 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$) foram identificados, pelo menos, um dos cinco alcaloides em aproximadamente 100 amostras de plantas. Especificamente, para a *P. incarnata L.*, os autores identificaram e quantificaram HOL (0,05 mg kg⁻¹), HLOL (0,09 mg kg⁻¹), HAE (0,11 mg kg⁻¹), HIE (0,23 mg kg⁻¹) e HLINE (0,2 mg kg⁻¹). Rehwald et al. (1995) desenvolveram um método de cromatografia (com detecção por fluorescência) que permite a separação (em 18 minutos) de cinco alcaloides β -carbolina (HOL, HLOL, HAE, HIE E HLINE), utilizando gradiente de eluição com uma fase móvel aquosa tamponada com fosfato (pH 8)

contendo de 34 a 50% de uma mistura de acetonitrila/metanol 50/50 v/v. Os extratos de *Passiflora incarnata* foram submetidos a um procedimento de separação em fase sólida (SPE) catiônica de modo a limpar a amostra e concentrar os analitos. Dezesete amostras foram examinadas, mas em apenas uma, um alcaloide β -carbolina (neste caso HAE) foi encontrado acima do limite de detecção (LOD) de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Cepas et al. (1996) utilizaram um sistema de detecção integrado de derivatização e quimioluminescência (CL) acoplado a um cromatógrafo líquido para a determinação de seis β -carbolicas (HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE E HLINE). Foram acopladas duas colunas C18, em linha para auxiliar na separação dos alcaloides, e a eluição foi realizada por gradiente (com metanol variando de 55 a 100%) obtendo-se um tempo total da corrida cromatográfica de 30 minutos. A CL foi produzida por uma reação pós-coluna das β -carbolicas com bis(2,4-dinitrofenil)oxalato (DNPO) na presença de peróxido de hidrogênio. O uso da CL dos alcaloides, ao invés da fluorescência nativa destes, permitiu o alcance de limites de detecção na faixa de ng mL^{-1} que possibilitaram a determinação de seis alcaloides (HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE), em espécies de borboletas (as amostras foram previamente extraídas com metanol e submetidas à SPE).

A primeira tentativa para a utilização de sistemas organizados para determinar β -carbolicas por cromatografia foi feita por Cheng e Mitchelson (1997), mais tarde melhorada por Marques et al. (2008). O método desenvolvido permitiu a separação de seis dos alcaloides utilizando cromatografia eletrocinética capilar (MEKC). O eletrólito de corrida consistiu de uma mistura contendo tampão borato (pH 9,0), dodecilsulfato de sódio (SDS) e 15% de ACN. De modo a vencer as limitações impostas pela espessura do capilar na detecção absorciométrica, os alcaloides foram detectados por fluorescência induzida a laser (488/520 nm). Não foram analisadas amostras reais e não se reportou valores de LOD (Cheng e Mitchelson, 1997).

Assim, como foram identificados e determinados os alcaloides β -carbolicas em espécies de plantas do gênero *Passiflora* em um número considerável de trabalhos científicos, escolheu-se aplicar a metodologia proposta por MLC em amostras destas plantas.

Na Tabela 2 são apresentadas uma descrição dos parâmetros cromatográficos, os alcaloides determinados, a faixa de trabalho, o consumo de solvente orgânico, os

limites absolutos de detecção (ALOD) e de quantificação (ALOQ), além dos resultados de recuperação e o tipo de amostra analisada em 15 métodos desenvolvidos, entre os anos de 1989 e 2011, que envolveram a separação e a quantificação das β -carbolinas por HPLC e MEKC.

Tabela 2. Comparação entre as métodos para determinação das β -carbolinas por HPLC e por MEKC.

Referência	Método	β -carbolinas analisadas	Faixa de trabalho	Consumo de solvente orgânico ^a (mL)	ALOD/ALQ ^b (ng)	u_c (%)	Recuperação (%)	Amostras
Moncrieff, 1989	Coluna C18, FM: ACN:MeOH:tampão fosfato pH 7,2, HAE: 39:13:48 v/v/v, HIE: 30:30:40 v/v/v, HLINE: 40:30:30 v/v/v, Eluição isocrática, FLD, Analisados separadamente, FLD, em nm: HAE: 238/435; HIE: 244/425 e HLINE: 374/485.	HAE HIE HLINE	0,2 – 200 ^c 0,004 – 0,02 ^c (ng)	6,24 7,2 8,4	0,01/Nd 0,05/Nd 0,02/Nd	Nd	99 93 92	Tecido de cérebro, fluido cerebrospinal e plasma sanguíneo de ratos.
Adachi, et al., 1991	Coluna C18, FM: MeOH: tampão fosfato - pH 3; (32:68 v/v); Eluição isocrática. FLD: $\lambda_{exc/em}$ 300/433nm. LC-MS: FM: MeOH: tampão formato de amônio/ácido fórmico pH 3,4 (23:77 v/v), Eluição isocrática. NOR: m/z = 169 e HAE: m/z =183.	HAE NOR	1 – 10 5 – 50 (ng mL ⁻¹)	5,76	0,002/ Nd 0,002 / Nd	Nd	100 90	Alimentos e bebidas alcoólicas
Gross e Griiter, 1992	TSK gel ODS80, FM: 10 mmol L ⁻¹ TEA:ácido fosfórico pH 3,2: TEA:ácido fosfórico pH3,6: ACN, Eluição por gradiente, Detecção absorciométrica e fluorescência: 300/440 nm.	HAE NOR	Nd	8,1	1 ng g ⁻¹ e / Nd	Nd	> 60	Salmão frito e carne bovina
Rehwal et al., 1995	Coluna LiChroCART Aluspher RP select B (modificada com óxido de alumínio), FM: tampão fosfato – pH 8: MeOH/ACN. Eluição por gradiente. Detecção por UV: 255, 240 e 370 nm e rampa de comprimento de onda fluorescência, em nm: HOL: 245/449, HAE 230/43, HIE 245/414, HLOL 230/525, HLINE 229/480.	HOL HLOL HAE HIE HLINE	- - 0,104 – 130 65 – 145 63,7 – 719 (μ g mL ⁻¹)	6,1	Apenas para HAE 1,5 (UV)/ Nd 0,5(FLD)/Nd	Nd	Apenas para HAE 98	17 plantas de <i>Passiflora incarnata</i> e <i>Passiflora coerulea</i>
Cepas et al., 1996	2 colunas C18 acopladas, FM: gradiente de eluição inicialmente 55:45 v/v de MeOH:TEA 0,01% para 100% de MeOH após 20 minutos de corrida, derivatização quimiluminescente pós-coluna com bis(2,4-dinitrofenil)oxalato e peróxido de hidrogênio e sistema de detecção externo ao cromatográfico. Detecção por espectrofluorímetro $\lambda_{exc/em}$ 370/425 nm.	HOL HLOL HAE NOR HIE HLINE	15 – 594,7 30 - 120 14,6 - 546,6 15,1 – 605,5 14,9 – 530,6 0,54 – 771,3 (ng)	14,7	2,5 / Nd 3,7/ Nd 2,0 / Nd 2,3 / Nd 2,4 / Nd 0,06 / Nd	Nd	Nd	Borboletas da espécie <i>Heliconiini</i>
Cheng e Mitchelson, 1997	MEKC – BGE: SDS 50 mmol L ⁻¹ , ácido bórico (20 mmol L ⁻¹), 15% p/v de ACN e 0,75 mol L ⁻¹ de uréia e ajuste de pH 9,0. Temperatura de 25 °C, voltagem 25 kV e tempo de injeção de 75 s. Detecção por DAD em 254 nm. HOL também foi detectado por fluorescência induzida por laser em 488/520 nm.	HOL HLOL HAE NOR HIE HLINE	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Tsuchiya et al., 1999	Coluna C8, FM: ACN: ácido trifluoroacético: H ₂ O (18:0,2:81,8 v/v/v), rampa de $\lambda_{exc/em}$, em nm: HOL: 325/417, NOR e HIE: 300/447 e HAE:300/430.	HOL HAE NOR HIE	0,4 – 4,0 0,2 – 2,0 0,2 – 2,0 0,4 – 4,0 (ng mL ⁻¹)	3,24	Nd / Nd	Nd	80,3 a 99 73,3 a 99,3 72 a 104,7 66 a 102,3	Raízes de Plantas medicinais: <i>Passiflora incarnata</i> , <i>Tribulus terrestris</i> , gengibre, ginseng, dentre outros.
Zheng et al., 2000	Coluna C18, FM: MeOH: tampão fosfato de potássio: ácido fosfórico pH 6,5 (70:30 v/v), FLD: 300/435 nm. Eluição isocrática.	HAE HIE	10 – 100 (ng mL ⁻¹)	7,7	0,01 / Nd 0,004/ Nd	Nd	59 64	Sangue humano e de ratos

Tabela 2. Continuação.

Grice et al., 2001	Coluna C18, FM: H ₂ O:MeOH: 5% HOAc, Eluição por gradiente, FLD: 254/414nm e UV: 254 nm.	HOL HAE HIE	200 – 60000 (ng mL ⁻¹)	25,25	2x10 ⁻⁴ / Nd 4x10 ⁻⁴ / Nd 8x10 ⁻⁵ / Nd	Nd	78 92 81	Planta medicinal: <i>Passiflora incarnata</i>
Yritia et al., 2002	Coluna C18, FM para HIE e HLINE: solvente A (63:37 v/v) tampão acetato de amônio pH 8,0:ACN/MeOH (20:30 v/v) e solvente B: mistura de ACN:MeOH (20:30 v/v), Eluição por gradiente. FLD: HIE: 260/370 nm, HLINE:340/495 nm FM para HOL e HLOL: solvente A (73:27 v/v) tampão acetato de amônio pH 6,3:ACN/MeOH (20:30 v/v) e solvente B: mistura de ACN:MeOH (20:30 v/v), Eluição isocrática. FLD: HOL/HLOL:340/495 nm	HOL HLOL HIE HLINE	0,3 – 50 0,3 – 50 0,5 – 50 0,3 – 25 (ng mL ⁻¹)	15,14 ^d	0,006/ 0,02 0,006/ 0,02 0,006/ 0,03 0,006/ 0,02	Nd	89,8 91,9 102,1 91,5	Plasma humano após a administração de chá de <i>Ayahuasca</i> (planta psicotrópica)
Kartal et al., 2003	Coluna C18, FM: álcool isopropílico: ACN: H ₂ O: ácido fórmico (100:100:300:0,3 v/v/v/v) pH 8,6 ajustado com TEA, Eluição isocrática. UV: 330 nm	HOL HLOL HIE HLINE	9,37 – 250 30,75 – 246 31,25 – 500 31 – 248 (10 ³ ng mL ⁻¹)	9,6	31,3 / 93,8 102,5/ 307,5 46,9/ 156,3 103,30/ 310	Nd	95,1 99,7 98,8 99,7	Sementes de <i>Peganum harmala L.</i>
Abourashed et al., 2003	HPLC <i>Fingerprinting</i> , Coluna C18, FM: acetado de sódio:ácido acético pH4:metanol, Eluição por gradiente, de 25 para 55% para o solvente B por 20 minutos. UV: 340 nm	HOL HLOL HAE HIE HLINE	0,0-50000 (ng mL ⁻¹)	8,4	0,2 / 1 ^f	Nd	95	104 espécies do gênero <i>Passiflora</i>
Tsuchiya, 2004	Coluna C8, FM: ácido trifluoracético: ACN: H ₂ O (0,2:20:79,8 v/v/v), 50°C, FLD: 300/430 nm. HPLC/MS/MS, FM: ácido fórmico:MeOH:H ₂ O (0,1:22:78 v/v/v). Para NOR: <i>m/z</i> = 169-115 e HAE: <i>m/z</i> =183-115.	HAE NOR	0,1 – 10 (ng mL ⁻¹)	4,2	Nd/ Nd	Nd	70,7 72,2	Cabelo de pessoas fumantes, alcoólicos e não-fumantes (que não consomem bebidas alcoólicas) e autistas,
Herraiz, 2004	LC/MS, Coluna C18, FM: Solvente A: tampão fosfato de amônio:ácido fosfórico pH 3:solvente B: 20% A em ACN, Eluição por gradiente, FLD: 300/433 nm. NOR: <i>m/z</i> = 169,1 e HAE: <i>m/z</i> =183,1.	HAE NOR		30,11	0,03 / Nd (ng g ⁻¹)	Nd	> 96	Diversos alimentos e fumaça de cigarro.
Back et al., 2009	LC/MS, Coluna C8, ACN: 30 mmol L ⁻¹ de tampão formato de amônio pH 3,7. Eluição por gradiente. NOR: <i>m/z</i> = 169 e HAE: <i>m/z</i> =183.	HAE HAE NOR	5 – 500 (ng mL ⁻¹)	9,24	0,005/0,016 0,01/0,04	Nd	25,6 25,01	Bacon e carnes cozidas e grelhadas de frango e porco.
González-Ruiz et al., 2011	Coluna C1, Proposta de duas metodologias. 1 ^a - MeOH: tampão fosfato - pH 7,8; (40:60 v/v) / HP β-CD 15 mM 2 ^a - EtOH: tampão fosfato - pH 7,8, (25:75 v/v) + HPβ-CD 15 mM Eluição isocrática. FLD: 290/430nm.	HAE NOR HIE	9,11 – 91,1 8,41 – 84,1 10,6 – 106,1 (ng mL ⁻¹)	4,32 / 4,05 ^h	0,014/0,046 ^g 0,012/0,04 ^g 0,015/0,05 ^{e, g}	Nd	98,2 / 99,8 ^h 97,0 / 100,9 97,9 / 101,2	Plasma humano

FLD: detector fluorescência; MeOH: álcool metílico; EtOH: álcool etílico; ACN: acetonitrila; Nd – não determinado; *u_c* – incerteza combinada

a – Na contagem do volume de solvente orgânico gasto, não foi levado em consideração o volume de solvente utilizado no tempo de reequilíbrio da coluna; b – Limite de Detecção (ALOD) e Limite de Quantificação (ALQ) absolutos em massa; c – Para cada amostra tem uma faixa de concentração dos alcaloides diferentes. A primeira faixa foi preparada para tecido do cérebro e a segunda foi feita para o plasma e fluido cérebro espinhal de ratos; d – Volume total relativo ao gasto de solvente orgânico nos dois métodos; e – Valores estimados após a pré-concentração.

f – Volume de injeção considerado igual a 20 µL.

g – Valores estimados de ALOD e ALQ para a 1^a proposta de metodologia.

h – Valores de volume de solvente gasto e recuperação para as duas propostas de metodologia.

i – Estimativa das incertezas em três níveis de concentração situados no início / meio / fim da curva analítica.

j – Valores médios para recuperação das duas concentrações avaliadas.

2.1.3

Propriedades ácido-base e fotofísicas das β -carbolinas

Os valores das constantes de ionização de ácidos ou bases fracas são parâmetros importantes para indicar a extensão de ionização de moléculas em solução aquosa. As características ácido-base das moléculas orgânicas afetam suas propriedades físico-químicas assim como suas ações biológicas, logo é importante conhecer o comportamento dessas substâncias quando se deseja estudá-las em sistemas aquosos. Diferentes abordagens são descritas na literatura para a determinação dos valores de pK_a do estado fundamental (S_0) de ácidos fracos ou de bases fracas, como, por exemplo, a titulação potenciométrica, a determinação espectrofotométrica e as medições condutimétricas (Niazi et al., 2008).

Quando uma substância orgânica absorve energia de fótons (na região do UV-vis), ela é elevada a um estado de energia excitado (S_1) onde ocorre a redistribuição dos elétrons nos átomos constituintes desta molécula. Tal redistribuição promove mudanças nas suas propriedades físico-químicas, em especial decorrente da variação de momento de dipolo. Nas substâncias aromáticas, por exemplo, a constante de ionização em meio aquoso é modificada significativamente em função da redistribuição dos elétrons na estrutura.

As propriedades fotofísicas das β -carbolinas são determinadas pela presença de dois átomos de nitrogênio em anéis diferentes em sua estrutura, os anéis piridínico e pirrólico. O átomo de nitrogênio piridínico possui maior caráter básico que o nitrogênio do pirrol, sendo que as capacidades de receber ou doar prótons desses nitrogênios são afetadas pelos substituintes presentes na estrutura. Assim, as β -carbolinas, em solução aquosa, podem se comportar como doadoras ou receptoras de próton dependendo do pH do meio. Como consequência, elas podem apresentar-se, nas formas neutra, catiônica, aniônica ou ainda como zwitteríon (apresentando simultaneamente cargas positiva e negativa em diferentes partes da estrutura) (Balón et al., 1987; Carmona et al., 2000). A formação de ânion de β -carbolina ocorre em meio extremamente básicos, com valores de 15 a 17 na escala de pH, dependendo da carbolinas (Bálon et al., 1987). Na Figura 4, para as seis β -carbolinas, são representados os processos de protonação do nitrogênio da piridina em meio ácido (formação da espécie catiônica a partir da espécie neutra) e de

desprotonação do nitrogênio do pirrol, em meio básico (formação da espécie aniônica).

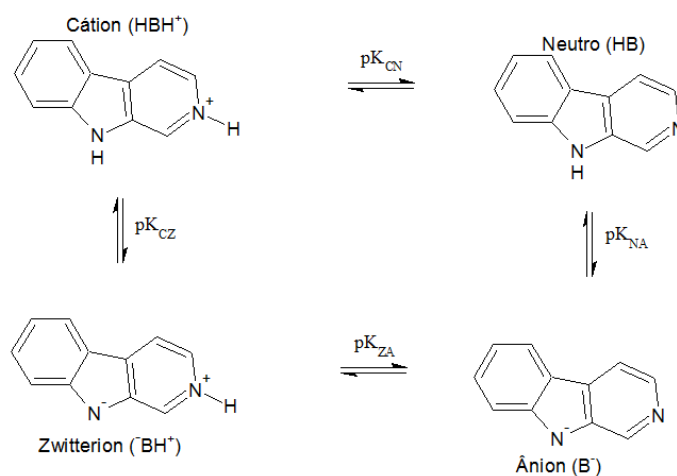


Figura 4. Esquema do equilíbrio ácido-base para β-carbolinas. As siglas pK_{CN}, pK_{NA}, pK_{ZA} e pK_{CZ} são as constantes ácidas para a interconversão entre as espécies catiônicas (C), neutra (N), aniônica (A) e zwitterion (Z) (adaptado de Thomas-Vert, 1983).

O valor do pK_a depende do tipo da β-carbolina, de seus substituintes e do sistema de solventes em que se encontra dissolvida (Martín et al., 2005). De uma forma geral, os derivados dihidro β-carbolina (HLINE e HLOL), os quais possuem uma ligação saturada entre os carbonos 3 e 4 (Figura 1), apresentam valores de pK_a maiores que as β-carbolinas 9H-pirido[3,4-b]indol (NOR, HAE, HOL e HIE), que possuem maior grau de aromaticidade (Balón et al., 1993 a; Tapia et al., 2003). O HIE, em comparação com a HAE e NOR, apresenta maior basicidade devido ao grupo metoxila ser um melhor doador de densidade eletrônica. O mesmo ocorre com o HOL, que possui uma hidroxila na posição C7 e um grupo metila na posição C1 (ambos doadores de densidade eletrônica), seja por efeito indutivo ou ressonante. Os valores das constantes do equilíbrio entre a forma catiônica e a neutra (pK_{CN}) dos alcaloides β-carbolinas encontrados na literatura científica estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores da literatura para pK_a do equilíbrio cátion-neutro (pK_{CN}) do estado fundamental.

Referência	pK_a CN	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLIN
Sakurovs, 1982		-	-	-	7,9	-	-
Thomas-Vert et al., 1983	$pK_a (S_0)$	-	-	7,7	7,2	8,0	-
Balón et al., 1993 b		9,51	11,30	7,34	6,85	7,73	9,54

Outro ponto relevante é o fato destes alcaloides apresentarem propriedades fluorescentes bastantes particulares (Martín, 2005). Quando excitados, o átomo de nitrogênio do anel piridínico se torna mais básico – aumento de 5 a 7 unidades no valor do pK_a – e o nitrogênio do pirrol assume uma maior acidez. Essa mudança da densidade de carga no nitrogênio justifica a diferença significativa do comportamento ácido-base das espécies no estado fundamental em relação ao estado excitado e que são refletidas espectralmente (Sakurovs e Ghiggino, 1982; Dias et al., 1992; Carmona et al., 2000; Tapia et al., 2003).

Dias et al. (1992) avaliaram as propriedades fotofísicas do estado excitado singlete das β -carbolinas NOR, HAE, HIE e HLINE tanto em solvente de menor caráter polar quanto em solvente prótico. Quando os alcaloides são excitados a partir de soluções com solventes pouco polares, detectou-se somente a espécie neutra N^* . Porém, em solvente prótico, foi observado um comportamento tautomérico, com a forma neutra N no estado fundamental e, após excitação, as formas zwitterión Z^* e as formas catiônicas C^* . Esse comportamento é consequência da diferença de densidade de carga no estado fundamental em relação ao estado excitado dos anéis pirrol e piridina. Em meio alcalino, após a absorção de fóton, é possível uma rápida transferência de prótons entre a espécie neutra excitada, N^* , e o solvente prótico, levando à formação das espécies Z^* e C^* , que após a emissão retornam aos estados fundamentais Z e C. A ausência de uma base forte, como um hidróxido, torna irreversível a interconversão do N^* para Z^* e de N^* para C^* (Sakurovs e Ghiggino, 1982; Thomas-Vert et al., 1983; Varela et al., 1995). Na Figura 5, esse comportamento é mostrado esquematicamente.

O espectro eletrônico obtido em meio aquoso com pH fortemente ácido corresponde ao da β -carbolina protonada (espécie catiônica). Um deslocamento

hipsocrômico observado em meio aquoso, com pH alcalino, sugere a transformação da espécie catiônica na forma neutra (Thomas-Vert, 1983). Em meio extremamente básico, em concentrações elevadas de hidróxido (acima de 6 mol L^{-1}), as espécies aniônicas são produzidas através da forma neutra devido à desprotonação do nitrogênio pirrólico, que pode ser identificado por uma nova banda de emissão na região do vermelho do espectro do visível (Thomas-Vert et al., 1983; Balón et al., 1987; Balón et al., 1993 b).

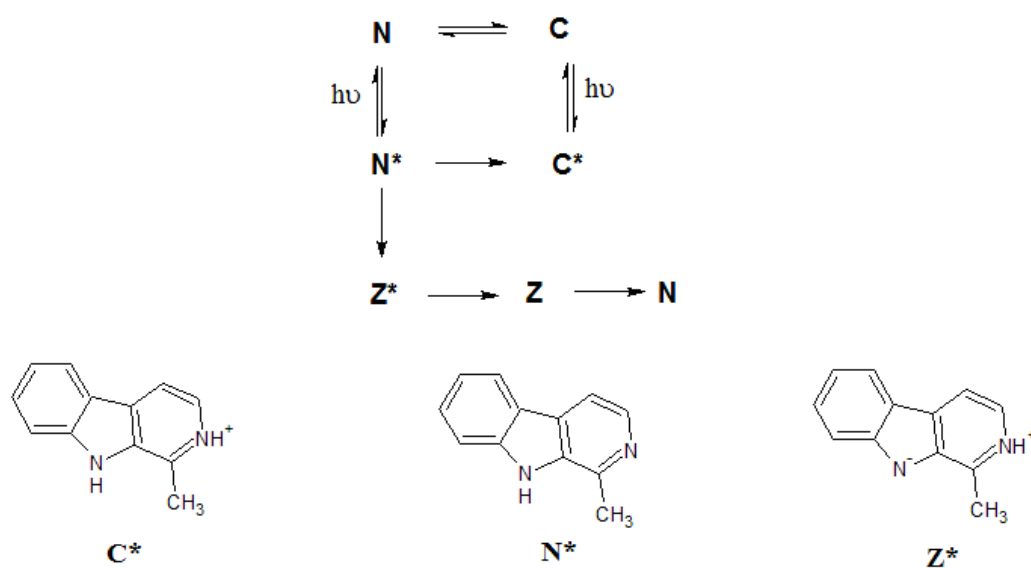


Figura 5. Representação esquemática do equilíbrio do HAE entre as formas neutras, catiônicas e zwitteriônicas no estado fundamental (N, C, Z) e excitado (N*, C*, Z*) (adaptado de Dias, 1992).

Os valores de pK_a (S_1) para o equilíbrio entre a forma neutra e a espécie aniônica são em torno de 8 a 12 dependendo do grau de aromaticidade do anel β -carbolínico. O HLINE e o HOL possuem valores de pK_a (S_1) maiores, pois estas substâncias se comportam como ácidos mais fortes quando excitadas em relação ao que ocorre no estado fundamental (ΔpK_a , que é o $pK_a^* - pK_a$, em torno de 6) (Balón et al., 1987).

2.1.4

Uso de surfactantes na determinação das β -carbolinas

O estudo das propriedades luminescentes das β -carbolinas em meio micelar despertou interesse da comunidade científica já que, em presença de surfactante, o processo de transferência do próton é alterado. Porém, essa

transferência depende da natureza do surfactante e do pH do meio. Por exemplo, a desprotonação do nitrogênio do anel pirrol, por adição de NaOH, foi facilitada na presença do surfactante brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) (Martín et al., 2005).

Um bom exemplo para a identificação da interação do surfactante com as β -carbolinas é o deslocamento da banda de emissão da fluorescência dos alcaloides, que depende da predominância no meio das espécies neutra, catiônica, aniônica ou zwitteriônica.

Em solução aquosa com pH muito ácido (pH 1) foi observado somente a fluorescência correspondente as espécies catiônicas, independentemente da natureza do surfactante. Por outro lado, em pH natural da solução (água purificada, em torno de 5,5), o meio micelar do surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) favoreceu a estabilização das formas catiônicas do HIE. Esse comportamento é decorrente da estabilização das espécies catiônicas pelas cargas negativas da superfície das micelas e pela rápida transferência de prótons do meio aquoso para o alcaloide neutro no estado excitado. Adicionalmente, por repulsão eletrostática, o meio micelar de SDS protege o fluoróforo da supressão dinâmica de fluorescência (*quenching* dinâmico) que seria causada por agentes supressores também aniônicos, aumentando assim a intensidade da fluorescência dos alcaloides (Martín et al., 2005).

Em meio de menor polaridade que a solução aquosa, a transferência de prótons não é favorecida, sendo assim é observada a fluorescência da espécie neutra dos alcaloides. Possivelmente, essas espécies estão localizadas no núcleo da micela. Em pH 13, em presença de SDS, foram observadas as bandas de emissão de fluorescência das espécies neutra e zwitteriônica para os alcaloides HAE e HIE. A intensidade da banda de emissão correspondente da forma zwitteriônica foi bem maior que a correspondente à espécie neutra, mostrando um favorecimento da estabilização da espécie carregada pela carga negativa da superfície da micela.

Neste mesmo pH, em meio de CTAB (surfactante catiônico), a forma aniônica das β -carbolinas foi detectada. A predominância dessa espécie neste meio pode ser explicada pelo favorecimento da desprotonação do nitrogênio do anel pirrólico, pela hidroxila do meio alcalino na superfície da micela catiônica. O mesmo não ocorreu em meios micelares aniônicos, como o SDS. Na Figura 6

estão ilustradas as diferentes espécies presentes no equilíbrio de transferência de prótons do HIE, em meio micelar.

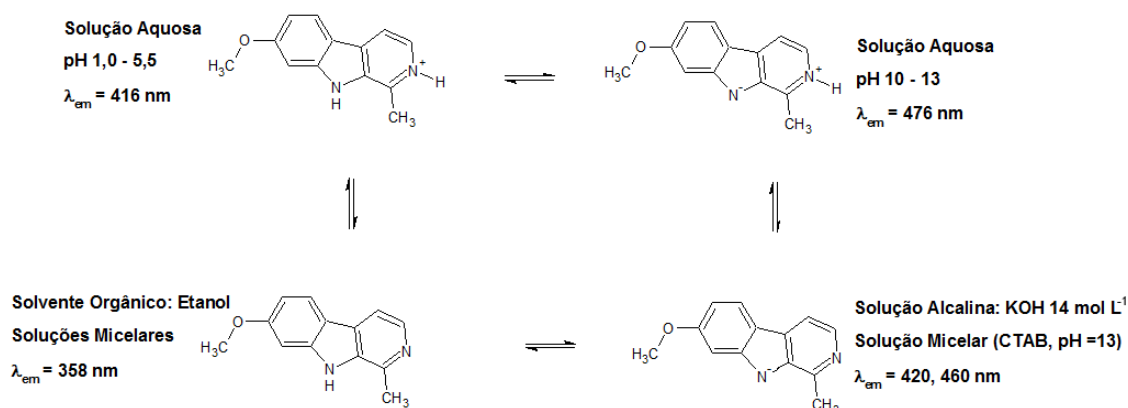


Figura 6. Esquema de diferentes espécies presentes no equilíbrio de transferência de prótons de β -carbolinas HIE (adaptado de Martín et al., 2005).

Em função do que foi apresentado, fica claro que a formação de micelas ou de outras estruturas organizadas pode aumentar a intensidade da fotoluminescência de várias espécies, porém, no caso dos alcaloides β -carbolinas, o surfactante deve ser escolhido de acordo com o pH do meio e a natureza da espécie predominante envolvida nesse equilíbrio. No caso do SDS, o maior aumento de fluorescência ocorre quando os alcaloides estão na forma catiônica (Martín et al., 2005).

2.1.5

Determinação do valor de $pK_a(S_0)$ de substâncias e do pK_a aparente de substâncias em sistema micelares

A determinação do valor do pK_a requer que a substância seja submetida a variações de pH, acompanhada da medida de uma propriedade físico-química que varie com o estado de ionização da molécula. Entre os vários métodos para a determinação do pK_a , se destacam a eletroforese capilar, a cromatografia líquida, a titulação potenciométrica e a espectrofotometria UV-visível. A titulação potenciométrica, aplicável para medir valores de pK_a entre 2 e 12, é a técnica mais utilizada. A sua limitação é a necessidade da solubilidade do composto em água ou em uma mistura com co-solvente (metanol ou ACN).

A espectrofotometria no UV-vis é bastante utilizada também na determinação do pK_a , sendo importante que a substância avaliada tenha grupo cromóforo próximo ao centro de ionização, de tal modo que, com a variação do pH, as formas ionizadas e neutras exibam diferenças espectrais. O método espectrofotométrico é considerado ideal para a determinação do pK_a de compostos pouco solúveis em água (solubilidade em água tão baixa quanto $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e apresenta como vantagens maior precisão e exatidão dos resultados. É interessante notar que a alteração do pH do meio leva a mudanças significativas nos valores das absorvâncias dos cromofóros (Tapia et al., 2003), assim, a escolha do pH da solução para a determinação do pK_a deve ser aquela onde existam ambas as espécies: não protonada (B) e protonada (BH^+) (Thomas-Vert et al., 1983).

A determinação dos valores de pK_a pelas titulações potenciométricas e espectrofotométricas, muitas vezes, é auxiliada por programas baseados nos princípios da quimiometria. Nesses programas, as análises são realizadas por regressão linear com ajuste de curva, como por exemplo, o SQUAD (Legget, 1985), o SPECFIT (Gamp et al., 1985), o HYPERQUAD (Gans et al., 1996), dentre outros *softwares* que foram criados com esse objetivo.

Os sistemas micelares, além de possuírem a propriedade de solubilizar substâncias hidrofóbicas, também possuem a habilidade de modificar as propriedades ácido-base das substâncias. Por isso, seu uso tem sido explorado em um número considerável de trabalhos envolvendo a titulação potenciométrica. Desta forma, é possível explorar as propriedades ácido-base dos compostos pouco solúveis em água nos meios micelares (contendo surfactantes na ordem do mmol L^{-1}), ao invés de se usar co-solventes orgânicos em quantidades percentuais relevantes. Porém, a resposta do eletrodo de membrana de vidro, sensível a íons H_3O^+ , é muito lenta em sistemas micelares e isso causa desvios na segunda e terceira casa decimal do valor de pH (Underwood, 1977; Gerakis et al., 1993). Essa resposta lenta se deve às interações entre os tipos de surfactantes e os íons participantes na determinação do potencial do eletrodo. No caso da titulação potenciométrica ácido-base em meio com SDS, ocorre uma interação entre o surfactante e os cátions H_3O^+ e Na^+ (provenientes da camada de gel hidratada do eletrodo de vidro). As micelas de surfactantes iônicos também atuam no potencial de junção do eletrodo e alteram a força iônica da solução (Gerakis et al., 1993).

Os sistemas micelares compostos por SDS tendem a provocar aumento do valor do pK_a de bases fracas e de diminuir o pK_a de ácidos fracos. Isso se deve ao fato do surfactante aniônico estabilizar a base protonada (BH^+) por interação eletrostática. No caso das espécies ácidas desprotonadas (A^-), ocorrem repulsão eletrostática, estabilizando a espécie HA (Gerakis et al., 1993; Ahmadi, 2007).

Em meios micelares, os surfactantes, normalmente, alteram as propriedades espectrais das moléculas, aumentando a intensidade e o deslocamento nas bandas de absorção. As mudanças se devem às interações hidrofóbicas e eletrostáticas das moléculas com o meio micelar (Niazi et al., 2008). Para as β -carbolinas, por exemplo, através da mudança no comportamento dos espectros de absorção, em sistemas com diferentes valores de pH, é possível calcular o valor desta constante de dissociação desses alcaloides.

2.2

Galantamina e seus principais metabólitos

2.2.1

Informações gerais

A galantamina (GAL) é uma amina terciária, cuja estrutura é apresentada na Figura 7. Sua constante ácida (pK_a) é igual a 8,2, sendo que a forma básica é mais solúvel em solventes orgânicos, incluindo metanol, do que a forma protonada desse alcaloide (Harvey et al., 1995).

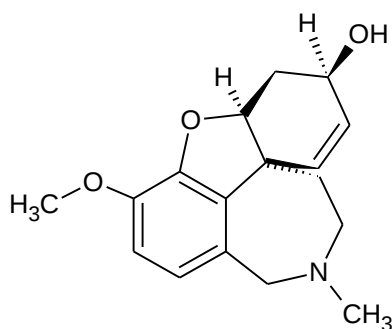


Figura 7. Estrutura química da galantamina (GAL).

Em 1950, a GAL foi descoberta acidentalmente nos bulbos de flores selvagens, a *Galanthus woronowii*, pertencente à espécie *Amaryllidaceae*. A extração desse alcaloide pode ser realizada a partir de várias espécies de plantas como a *Amaryllidaceae*, *Galanthus nivalis*, *Narcissus*, *Lycoris*, *Leucojum aestivum*, dentre outras espécies (Harvey et al., 1995). Embora a síntese completa da GAL ter sido alcançada, as plantas ainda representam uma importante fonte desses alcaloides para a indústria farmacêutica. Atualmente, a GAL é extraída das espécies de plantas *Leucojum aestivum* e *Narcissus* na Europa, e da *Lycoris radiata* e *Ungernia victoris* na Ásia (Berkov et al., 2009). O rendimento da GAL na espécie *Narcissus* pode variar de 9 a 16% do extrato seco da planta (Berkov et al., 2011). Inicialmente, a GAL foi usada como um agente para reverter o efeito da anestesia, sendo reportado por Mashkovskii, em 1955 (Thencheva et al., 1987). Atualmente, esse alcaloide é usado no controle de doenças neuromusculares, como a *miastenia gravis* (conhecida como a doença da fraqueza), no antagonismo

do bloqueio neuromuscular esquelético, na induz a depressão respiratória e no tratamento da doença de Alzheimer (Maláková et al., 2007).

A doença de Alzheimer (DA), descrita pela primeira vez pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma condição de desordem neurodegenerativa progressiva e irreversível responsável por cerca de 60% dos casos de demência entre idosos acima de 65 anos (Francis et al., 1999). Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer, ABRAz, estima-se que há 1 milhão e 200 mil de casos de pessoas afetadas por essa doença no Brasil contra 35,6 milhões de pessoas doentes no mundo todo (ABRAz, último acesso 27/11/14).

Também conhecida como Mal de Alzheimer, a DA representa um desafio para os pacientes e seus familiares, já que o convívio com a doença acarreta um desequilíbrio emocional e financeiro dos envolvidos. Com o avanço da doença, o paciente apresenta um declínio cognitivo e das funções psicomotoras, se tornando incapaz de realizar tarefas básicas da vida diária e de reconhecer os familiares mais próximos, resultando em morte em, aproximadamente, 10 anos (ABRAz, último acesso 27/11/14).

Os déficits cognitivos e psicomotores são provocados pelo declínio da neurotransmissão colinérgica dos hipocampus e neocorticais, reduzindo a atividade da colina acetiltransferase (enzima responsável pela síntese de acetilcolina – ACh) e pela diminuição do número de receptores nicotínicos ACh no cérebro dos pacientes (Whitehouse et al., 1982). Apesar da causa da DA não ser totalmente conhecida muitos cientistas relacionam a gravidade da doença com o número de receptores nicotínicos.

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) se mostram dominantes sobre o tratamento sintomático da doença de Alzheimer. Em 1993, o inibidor de colinesterase, denominado tacrina, foi o primeiro inibidor aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, para o tratamento da DA. Após a tacrina, foram aprovados os inibidores donepezil, em 1996, e a rivastigmina, em 2000. Em 2001, a síntese completa e o uso da GAL foram aprovados pela FDA para o tratamento da DA em estágios de moderado a médio (Janssen et al., 2002), servindo de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos. A GAL, inibidor reversível, competitivo e seletivo, exibe um modo dual de ação: a inibição da AChE e a modulação positiva dos receptores nicotínicos (ACh) que aumentam a resposta do neurotransmissor ACh (Bores et

al., 1996). Os dados de um grande número de ensaios clínicos têm demonstrado que a GAL melhora significativamente, num período de 12 meses, a função cognitiva em pacientes com DA (Zhao et al., 2002).

2.2.2

Metabolização da galantamina

A administração da GAL em humanos leva à formação no organismo de produtos resultantes da biotransformação oxidativa, como o *O*-desmetil galantamina (OD), o *N*-desmetil galantamina ou norgalantamina (ND), o *N*-óxido galantamina (NOx) e, também, a conversão quiral para epigalantamina (EP) (Mannes, 2002). No fígado, 75% da galantamina são metabolizadas pelo citocromo (hemoproteína) hepático P450, (principalmente, pelas isoenzimas CYP2D6 e CYP3A4) em metabólitos farmacologicamente menos ativos ou inativos, e os 25% restantes são eliminados sem transformação (Bachus et al., 1999).

As principais vias metabólicas da GAL são a glucuronidação, *O*-desmetilação, *N*-desmetilação, *N*-oxidação, epimerização e conjugação com sulfato. O CYP2D6 é responsável pela formação do *O*-desmetil galantamina e o CYP3A4 está envolvido na produção do *N*-óxido galantamina (Zhao et al., 2002). Na Figura 8 são apresentadas as estruturas químicas dos principais metabólitos da GAL.

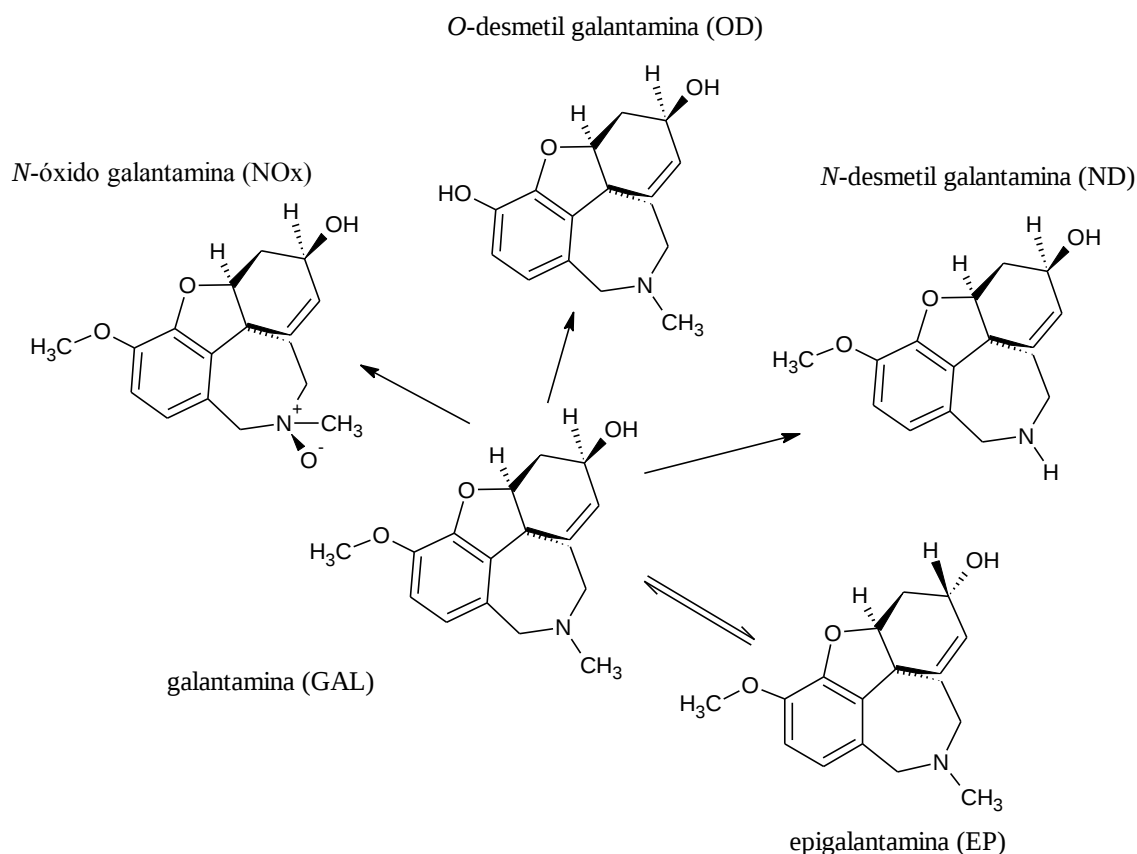


Figura 8. Estrutura molecular dos principais metabólitos da galantamina: *N*-óxido galantamina (NOx), *O*-desmetil galantamina (OD), *N*-desmetil galantamina (ND) e epigalantamina (EP).

2.2.3

Descrição dos principais métodos cromatográficos para determinação de galantamina

Vários métodos baseados na cromatografia líquida de alta eficiência para a GAL foram desenvolvidos nos últimos 30 anos, porém somente alguns métodos foram propostos para determinação de GAL e seus metabólitos. A grande maioria desses métodos utiliza fase móvel rica em ACN e/ou metanol, coluna com fase estacionária C18 e detecção óptica por fluorescência ou por absorção molecular.

Tencheva e colaboradores (1987) investigaram a farmacocinética da GAL em amostras de urina e de plasma humano de dez voluntários saudáveis e de dez pacientes usando HPLC com detecção absorciométrica. A fase móvel composta por água/metanol (60/40% v/v) foi eluída no modo isocrático (tempo total de corrida menor que 16 min). As amostras foram tratadas com tricloroacético, para precipitação das proteínas, e os analitos extraídos com clorofórmio. Nas amostras

de urina foram determinadas a concentração de GAL e dos metabólitos EP e galantaminone após 12 h da administração do medicamento, enquanto que nas amostras de sangue apenas o galantaminone não foi identificado.

Mannes et al. (2002) estudaram o metabolismo e excreção da GAL, marcada isotopicamente, em amostras biológicas (urina, fezes e plasma) de humanos, ratos e cachorros. A galantamina e seus metabólitos (ND, OD, NOx, EP, ND epigalantamina e OD epigalantamina, metabólitos glucuronídeos de GAL, OD, OD epigalantamina e OD sulfato) foram determinados por HPLC de fase reversa com detecção fluorimétrica, absorciométrica e por decaimento radioativo. O modo de eluição da fase móvel foi por gradiente utilizando duas soluções: um tampão de acetato de amônio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,1) e outro de acetato de amônio (1 mol L^{-1} , pH 6,1) contendo metanol e acetonitrila (10:10:80 v/v/v). Nos primeiros 2 minutos, o eluente foi composto de 100% da primeira solução tampão. Nos 40 minutos subsequentes, utilizou-se uma mistura de 75%, em volume, do primeiro tampão com 25% do segundo. Por fim, no minuto final, na fase móvel foi composta de 100% da segunda solução tampão (tempo total de corrida igual a 43 min). Em humanos assim como em várias espécies de animais a GAL e seus metabólitos foram excretados predominantemente em urina (60% nos ratos machos e 93% nas amostras de humanos). Zhao e colaboradores (2002) realizaram um estudo comparativo da farmacocinética e segurança da GAL em pacientes com insuficiência hepática com voluntários saudáveis. A GAL e a ND foram determinadas usando HPLC de fase reversa com detecção fluorimétrica para as amostras de plasma sanguíneo e por detecção absorciométrica para as amostras da urina dos indivíduos. Para a determinação de GAL e ND em plasma sanguíneo utilizou-se fase móvel composta por acetato de amônio/acetonitrila (85/15% v/v), enquanto que para a análise dessas substâncias em urina a fase móvel consistiu em acetato de amônio/acetonitrila (86,5/13,5% v/v). Os parâmetros farmacocinéticos da GAL em pacientes com insuficiência hepática, em estágios moderados a médio, foram similares aos do grupo controle (pacientes saudáveis), sendo recomendado o uso dessa droga nesses subconjuntos de pacientes. Verhaeghe et al. (2003) determinaram GAL em plasma humano por HPLC-MS-MS. O preparo das amostras consistiu em uma extração líquido-líquido com tolueno permitindo o uso de volumes reduzidos de amostra de 1,0 para 0,2 mL. A fase móvel (com eluição isocrática) consistiu em acetato de

amônio/ ACN (85/15% v/v). O tempo total de corrida foi de 2 minutos. O método proposto foi aplicado em 3000 voluntários e em três dosagens diferentes da droga. Zhang et al. (2007) compararam os perfis de farmacocinética da GAL em comprimido dispersível (comprimido, de alta absorção, que produz uma suspensão quando entra em contato com um líquido) com os comprimidos convencionais. A GAL foi determinada no plasma sanguíneo de dezoito voluntários sadios, do sexo masculino, por HPLC de fase reversa com detecção fluorimétrica, no qual permitiu limites de quantificação abaixo de 1 ng mL^{-1} . A fase móvel consistiu em ACN, água e trietilamina (20:80:1 v/v/v, pH 7,0). O tempo total de retenção da GAL foi de 5,5 min. A avaliação dos parâmetros de farmacocinética indicaram que as duas formulações podem ser consideradas bioequivalentes. Maláková et al. (2007) propuseram um novo método analítico para a identificação e determinação de GAL e seus metabólitos produzidos na fase I (biotransformação oxidativa) em plasma sanguíneo e tecidos (cérebro, fígado e hipófise) de ratos por HPLC com detecção absorciométrica, fluorimétrica e por espectrometria de massa. O método foi aplicado em estudos de farmacocinética e biotransformação da galantamina. As amostras de plasma e tecido (homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,4) foram extraídas em cartuchos de SPE. A eluição da fase móvel foi feita por gradiente iniciando com solução tampão acetato de amônio/ACN (85/15% v/v) e após 4 minutos, a proporção de ACN foi elevada para 25% e mantida constante por 26 minutos (tempo total de corrida foi de 30 minutos). Os valores de limite de quantificação (LOQ) para a GAL e seus metabólitos ficaram na faixa de 88 a 201 ng g^{-1} . O metabólito NOx não foi determinado em nenhuma amostra.

Berkov e colaboradores (2011) identificaram e quantificaram GAL por CG-MS em diferentes fontes de plantas: bulbos e folhas de *Narcissus confusus*, bulbos de *N. pseudonarcissus* cv. Carlton e folhas e culturas *in vitro* de *L. aestivum*. As amostras foram extraídas com metanol, derivatizadas e analisadas por CG-MS. Os níveis de GAL determinados nas amostras variaram de 0,35% (touceiras de *L. aestivum*) a 15,86% (bulbos de *N. confusus*) nos extratos secos. A análise do componente principal dos cromatogramas de CG-MS permitiu a discriminação das espécies, a parte das plantas analisadas e a região geográfica das amostras.

Culzoni et al. (2012) propôs um método de determinação de galantamina e seus principais metabólitos (OD, NOx, EP e ND) em amostras de soro sanguíneo por HPLC. A fase móvel consistiu em solução tampão de acetato de amônio (pH 5)/ACN (94/6% v/v). O tempo total de corrida foi de 6 min. As amostras foram fortificadas com a GAL e seus metabólitos e tratadas com ácido tricloroacético para a precipitação das proteínas. A detecção fluorimétrica foi feita por varredura dos espectros em três dimensões para a obtenção das matrizes da intensidade de fluorescência em função do tempo de retenção e comprimentos de onda de emissão. A resolução foi obtida na presença de interferentes da matriz das amostras de soro usando a resolução de curvas multivariadas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS). A combinação entre HPLC e MCR-ALS permitiu a simplificação do preparo da amostra utilizando um volume reduzido de soro sanguíneo (0,2 mL) e a redução do gasto de solvente orgânico seguindo os princípios da Química Verde.

Culzoni et al. (2010) propuseram determinar GAL por espectrofluorimetria utilizando matriz de excitação e emissão de fluorescência e calibração multivariada de segunda ordem. Como a GAL exibe fluorescência pouco intensa, os autores testaram vários meios organizados, como ciclodextrinas e micelas de diversos surfactantes, com o propósito de aumentar a fluorescência da substância. Entre os meios organizados estudados, o surfactante aniônico SDS resultou no maior ganho (aumento de seis vezes) de sinal da GAL, permitindo determinações em níveis de ng mL^{-1} , sem a necessidade de tratamento prévio da amostra. O método proposto foi aplicado em amostras de água fortificadas com GAL em presença de interferentes espectrais, resultando em determinações seletivas do alcaloide de interesse.

2.3

Cromatografia Líquida Micelar – Informações Gerais

2.3.1

Surfactantes e micelas normais e processo de micelização

Surfactantes (ou tensoativos) são moléculas anfifílicas, ou seja, que contém nas suas estruturas regiões com características hidrofílicas e outras com características hidrofóbicas que lhe conferem propriedades únicas quando dissolvidas em água. A estrutura típica de um surfactante consiste de uma cadeia carbônica hidrofóbica, denominada cauda do surfactante (geralmente linear e que varia comumente entre 8 e 18 átomos de carbono) e de um grupamento polar ou iônico (cabeça do surfactante). Dependendo da natureza do(s) grupo(s) polares ou iônicos presente(s) na estrutura, o surfactante pode ser classificado como aniônico, catiônico, não-polar e anfóteros (*zwitterionico*), este último tipo contendo grupos aniônicos e catiônicos na sua estrutura (Pelizzetti e Pramauro, 1985).

As moléculas anfifílicas podem dar origem a diferentes estruturas organizadas, conhecidas como micelas, micelas-reversas, micro-emulsões, monocapas, bicapas e vesículas dependendo de sua natureza química e das características do meio em que se encontram dissolvidas. Do ponto de vista analítico, pode-se citar algumas vantagens do uso de surfactantes: (i) aumentar a solubilização de moléculas hidrofóbicas em solventes ou ambientes polares e vice-versa, (ii) alterar as propriedades ácido-base e de oxirredução de espécies químicas que interagem com os sistemas organizados em solução, (iii) alterar a cinética de reação como, por exemplo, a de formação de um produto de interesse analítico e (iv) mudar as propriedades reacionais e de equilíbrio químico beneficiando a formação seletiva de um produto, (v) alterar propriedades ópticas de espécies químicas dissolvidas no meio organizado, (vi) alteração da compartimentação de espécies químicas na presença de surfactantes que possibilita a separação e extração seletiva, por exemplo, fazendo uso do ponto de nuvem (*cloud point*) do sistema organizado, (vii) alterar as propriedades de

retenção ou migração de espécies químicas num sistema dinâmico de separação (Pelizzetti e Pramauro, 1985; Esteve-Romero et al., 1995).

As micelas são associações de monômeros de surfactantes que se formam espontaneamente (sistemas favoráveis termodinamicamente) em dimensões coloidais (por exemplo, o diâmetro médio da micela de SDS em torno de 2 nm) quando uma concentração crítica de monômero no sistema é atingida (Pelizzetti e Pramauro, 1985). Essa concentração é denominada concentração micelar crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. Em baixas concentrações, os monômeros de surfactantes encontram-se adsorvidos na superfície (interface entre ar e água) da solução. Com o aumento da concentração, o número de monômeros adsorvidos aumenta formando uma monocamada desse surfactante, saturando a superfície da solução. Neste ponto, uma nova adição de surfactantes provoca agregação da parte hidrofóbica das moléculas resultando na formação de micelas que são constituídas por um conjunto de monômeros que se organizam em uma forma esférica (Pelizzetti et al., 2009). Quando a concentração do surfactante aumenta ainda mais, pode ocorrer o alongamento das micelas, principalmente se os surfactantes possuírem caudas hidrocarbônicas com número elevado de carbonos (Pelizzetti e Pramauro, 1985).

O processo normal de micelização em água ocorre em decorrência da ação das forças repulsivas eletrostáticas dos grupos hidrofílicos, nas cabeças da estrutura do surfactante, e das interações atrativas hidrofóbicas das caudas do surfactante. Os contra-íons desempenham um papel importante a favor da micelização, pois blindam a carga do agregado e diminuem o potencial elétrico e a repulsão entre as cabeças (Pelizzetti et al., 2009). Cada micela é formada por um determinado número de moléculas de surfactantes que constitui o número de agregação (geralmente entre 30 a 200 monômeros), que rege a geometria e o tamanho da micela. Na Figura 9, tem-se o modelo esquemático de uma micela iônica esférica (“normal”), em meio aquoso, onde o sinal + indica a localização dos contra-íons. As micelas “normais” possuem as cabeças dos surfactantes voltadas para a solução aquosa, enquanto que as respectivas caudas estão direcionadas para o centro da estrutura, resultando em um centro hidrofóbico favorável para a inclusão de espécies químicas de caráter menos polar (Pelizzetti e Pramauro, 1985)

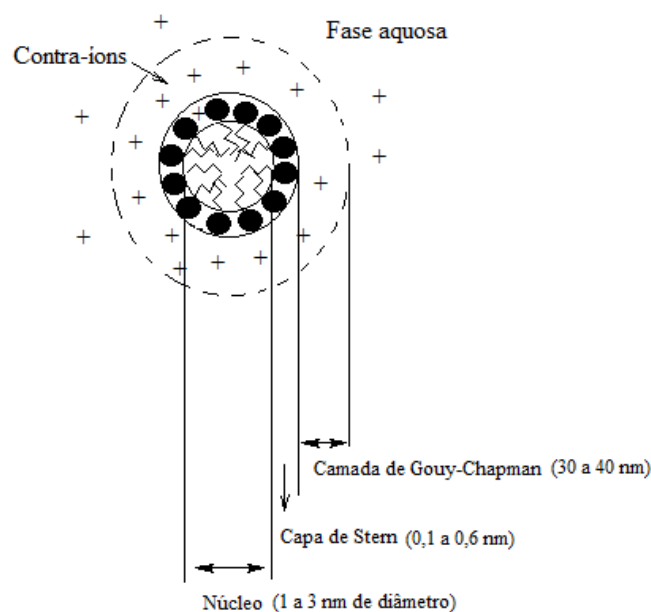


Figura 9. Representação bidimensional das regiões que formam uma micela iônica normal com estrutura esférica (Modelo de Sigter) (adaptado de Maniasso, 2001).

Quando micelas são formadas em solventes pouco polares, a estrutura do agregado será a inversa da micela “normal” obtida em água, isto é, as caudas dos surfactantes ficam voltadas para o meio orgânico e as cabeças formam um núcleo central polar. Este tipo de estrutura é conhecida como micela inversa ou invertida e que favorece a solubilização de substâncias polares em seu núcleo central.

Conforme dito, o valor da CMC é uma propriedade importante no processo de micelização e depende da estrutura dos surfactantes e de outras condições como a temperatura, a força iônica, a polaridade do meio e a natureza dos contra-íons do surfactante iônico. Dessa forma, a CMC é uma propriedade intrínseca e característica de cada surfactante a uma dada temperatura, em um sistema específico de solventes e em uma concentração eletrolítica determinada. Por exemplo, a CMC do dodecilsulfato de sódio (SDS) é $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ com número de agregados estimado em 62. Em concentrações acima do valor da CMC, os monômeros participam de um equilíbrio dinâmico entre a estrutura micelar organizada e a forma isolada em solução (Pelizzetti e Pramauro, 1985). As micelas são termodinamicamente estáveis, porém, podem ser destruídas quando são diluídas em água de tal forma que a concentração do surfactante atinge valores abaixo aos da CMC.

O ponto de Krafft é definido como a temperatura mínima requerida para dissolver completamente o surfactante em solução aquosa. Por exemplo, para o SDS o ponto de Krafft é 15°C. Abaixo do ponto de Krafft, a solução aquosa do surfactante torna-se turva, por causa da fração que não se solubiliza no sistema. Acima do ponto Krafft, a solubilidade do monômero aumenta até o ponto no qual se inicia o processo de micelização e as espécies agregadas passam a ser a forma termodinamicamente favorecida (Shinoda e Fontell, 1995). Existe um ponto triplo (temperatura em função da concentração de surfactante) onde o surfactante co-existe em três estados: (i) monômeros em solução aquosa (acima do ponto de Krafft, mas abaixo da CMC), (ii) micelas em solução aquosa (acima do ponto de Krafft da CMC) e (iii) sólido hidratado e fase aquosa (abaixo do ponto de Krafft e da CMC). (Shinoda e Fontell, 1995).

Do ponto de vista termodinâmico, a formação de micelas favorece o incremento na solubilidade do surfactante, dado que em concentrações elevadas (acima da CMC) e, em temperatura constante, a concentração dos monômeros em equilíbrio com as micelas é praticamente constante enquanto a concentração das micelas é variável. Assim, a solubilidade total do surfactante (isoladamente ou como micela) é favorecida pela formação das micelas no meio.

Vale salientar que os surfactantes não-iônicos não apresentam ponto de Krafft, mas possuem uma relação característica de temperatura/solubilidade em água, na qual se tornam menos solúveis com o aumento da temperatura. Em alguns casos, a separação de fases é observada, produzindo uma névoa em suspensão. A temperatura na qual ocorre este fenômeno é denominada ponto de nuvem do surfactante.

Uma das mais importantes propriedades das micelas normais é a de melhorar a solubilização de moléculas orgânicas hidrofóbicas em meio aquoso. Não se deve confundir o termo solubilização micelar, que está relacionado com a solubilidade das micelas no meio, com solubilidade em soluções ricas em micelas (“soluções micelares”), que é a solubilização de um determinado soluto em um meio organizado com micelas (Khaleli, 1997). Os possíveis sítios de interação entre a molécula hidrofóbica e a micela são apresentados na Figura 10: A) adsorção na superfície da micela (interface micela-solvente - camada de Gouy-Champan); B) inserção entre as cabeças hidrofílicas, no caso de surfactante não-iônicos; C) inserção entre os grupos hidrofílicos – camada de Stern; D) penetração

no núcleo da micela. Entende-se que o sítio de maior solubilização é na interface da camada de Stern (Pelizzetti e Pramauro, 1985).

Pequenas quantidades de substâncias de caráter menos polar podem ser dissolvidas no sistema aquoso ao serem incluídas no núcleo hidrofóbico das micelas normais (sítio D), enquanto substâncias com caráter muito polar ou mesmo as substâncias iônicas ficam fora da micela (sítio A). Já as substâncias com caráter polar intermediário ficam distribuídas entre a camada polar de Stern da micela (sítio C) e na interface da micela com a fase aquosa (sítio B). Vale salientar que a camada de Stern de micelas formadas por surfactantes não-iônicos (sítio C) é maior que a das micelas formadas por surfactantes iônicos. Frequentemente, a solubilização de compostos nas micelas modifica o processo de micelização, causando aumento ou diminuição na CMC (Berthod e García-Alvarez Coque, 2000).

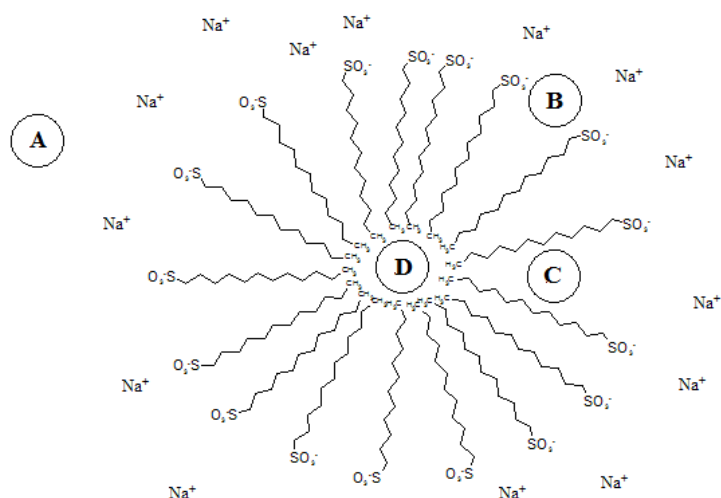


Figura 10. As letras A (adsorção na superfície da micela - Camada de Gouy-Champan), B (inserção na entre as cabeças hidrofílicas), C (inserção na entre os grupos hidrofílicos - Camada de Stern) e D (penetração no núcleo da micela) indicam as possibilidades de interações entre o soluto e a micela (adaptado de Maniasso, 2001).

2.3.2

Cromatografia Líquida Micelar

Em 1976, Knox e Laird desenvolveram a cromatografia líquida de par iônico (IPC), que consiste basicamente na adição de pequena quantidade de surfactante iônico na fase móvel hidro-orgânica polar da cromatografia líquida de

fase reversa. Em tal situação os monômeros dos surfactantes são adsorvidos na fase estacionária de tal forma que a interação entre a fase estacionária modificada com surfactante e o soluto (na forma iônica) na fase móvel se dá por atração eletrostática. Nos estudos com IPC foi observado que quanto maior era o número de carbonos na cadeia alquila do surfactante, maior era a adsorção de monômeros de surfactantes na fase estacionária. Também foi constatado que quando a fração de solvente orgânico -metanol, acetonitrila (ACN) ou propanol - na fase móvel era aumentada, menor era a adsorção dos surfactantes na fase estacionária, devido ao aumento na força de eluição e desorção dos surfactantes da fase estacionária. A princípio, a abordagem de separação por IPC não foi bem sucedida em termos de reprodutibilidade dos resultados, devido à baixa estabilidade da fase estacionária modificada (Berthod e García-Alvarez Coque, 2000). No entanto, a técnica se mostrou promissora na separação de macromoléculas como proteínas e nesse tipo de aplicação tem encontrado espaço para se desenvolver.

Armstrong e Henry, em 1980, demonstraram que soluções aquosas organizadas com micelas poderiam ser usadas como fase móvel em separações de solutos por cromatografia líquida de fase reversa, nomeando esta técnica como Cromatografia Líquida Micelar (MLC do inglês *Micellar Liquid Chromatography*). A MLC é um tipo de cromatografia de fase reversa na qual a fase móvel da cromatografia convencional é uma mistura homogênea, enquanto que a fase móvel em MLC é microscopicamente heterogênea e composta por dois meios, um deles composto de agregados micelares e o outro é a mistura hidro-orgânica que contém os monômeros dos surfactantes em concentração acima da CMC (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000). Como mencionado, em soluções aquosas de surfactante de concentração acima da CMC, o número de micelas na solução cresce. Considerando que o número de monômeros na fase móvel permanece sempre o mesmo, ocorre adsorção de uma quantidade fixa de monômeros de surfactantes na fase estacionária, o que resulta em uma coluna modificada estável e com comportamento de retenção regular (Ruiz-Ángel et al., 2009).

A MLC vem ganhando espaço como uma abordagem alternativa de cromatografia líquida cuja vantagem principal advém do aumento significativo da capacidade de separação graças à maior complexidade de interações entre os solutos, as fases móveis e a fase estacionária, possibilitando até mesmo a

separação de compostos iônicos e não-iônicos, mais polares e menos polares na mesma corrida cromatográfica (Rambla-Alegre et al., 2009). Outra vantagem da MLC vem do fato de se trabalhar com uma fase móvel essencialmente aquosa, que é menos tóxica em relação às misturas contendo proporções significativas de metanol ou acetonitrila, usadas comumente em cromatografia líquida de fase reversa. As fases móveis micelares são também de menor custo, já que as CMC são alcançadas em baixas concentrações de surfactantes, ou seja, com um gasto pequeno do produto tensoativo, em comparação aos volumes significativos de solventes orgânicos de alta pureza requeridos na abordagem cromatográfica reversa. Essas fases móveis micelares são menos inflamáveis e mais biodegradáveis, porém, a grande vantagem decorre do seu poder de solubilização de solutos hidrofóbicos em fase móvel aquosa. Em MLC, o gradiente de eluição é favorecido em concentrações moderadas de surfactante iônico, pois a composição da fase estacionárias permanece constante durante o gradiente. Portanto, o único processo de reequilíbrio necessário, antes da próxima execução de gradiente, é a lavagem do sistema cromatográfico, com a fase móvel inicial (Madamba-Tan et al., 1994). A inclusão em sistemas organizados também tende a favorecer a eficiência quântica de fluoróforos, o que é vantajoso no caso da detecção fluorimétrica.

Do ponto de vista da análise de amostras complexas, como fluidos biológicos, é muito comum que a abordagem de MLC possibilite a injeção direta de amostras (virtualmente sem passar por nenhum pré-tratamento) no sistema cromatográfico, uma vez que o surfactante compete com as proteínas pelo soluto de interesse, promovendo assim, a ruptura da ligação proteína-analito. As proteínas não precipitam dentro da coluna cromatográfica, pois são solubilizadas na fase móvel micelar e percolam na coluna sem causar danos a mesma, sendo eluídas com ou logo após o solvente (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000). Ao se evitar etapas de separação dos analitos dos componentes da matriz, o procedimento analítico é simplificado e os custos associados diminuídos (Rambla-Alegre et al., 2010).

Vale salientar que um dos fatores mais importantes do uso da MLC é o fato de se poder utilizar o equipamento tradicional de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sem que haja necessidade de condições e de equipamentos especiais (Berthod, 1997). Na MLC têm sido usadas as fases estacionárias

tradicionais para HPLC de fase reversa, sendo as mais comuns as do tipo C8, C18 e cianopropil. Já os surfactantes mais comuns utilizados na fase móvel micelar são o SDS (surfactante aniônico), o brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), que é um surfactante catiônico, e o polioxietileno lauril éter (Brij-35), um surfactante neutro (Ruiz-Ángel et al., 2009). Em relação à cromatografia líquida de fase reversa, a MLC apresenta algumas desvantagens, sendo as mais importantes os elevados tempos de retenção associados à interação do soluto com o meio micelar e a menor eficiência dos picos. As razões disso serão abordadas mais adiante.

Um surfactante adequado para fins práticos de MLC deve ter baixo valor da CMC e, preferencialmente, o ponto de Krafft menor que a temperatura ambiente, para que haja solubilização efetiva do surfactante em água. Surfactantes com valores elevados de CMC resultam em fase móvel micelar com alta viscosidade o que não é desejável em regime de alta pressão, como os alcançados no sistema típico de HPLC. Além disso, quando a detecção óptica é utilizada, o surfactante deve ter baixa absorvidade molar no comprimento de onda de operação (Khaledi, 1997).

Em 1983, Dorsey et al. recomendou a adição de uma pequena fração (3% em volume) de propanol e a elevação da temperatura de operação para 40°C, para aumentar a eficiência das separações em MLC. Após a apresentação desse trabalho pioneiro, a maioria dos estudos com MLC que se seguiram utilizaram pequenas proporções de alcoóis de cadeia curta ou média ou mesmo de ACN (denominados modificadores orgânicos) na fase móvel micelar, o que ficou conhecido como fase móvel micelar híbrida. A adição do solvente orgânico aumenta a força da fase móvel, melhorando a eficiência dos picos cromatográficos, em especial, para os solutos não-polares. Como regra geral, as quantidades adicionadas desses modificadores orgânicos devem ser pequenas, ficando muito abaixo de 20% (em volume), o que garante a integridade das micelas na fase móvel (Khaledi, 1997).

A adição de modificadores orgânicos pode alterar a CMC do surfactante, o número de moléculas agregadas e a polaridade da fase móvel. Por exemplo, o metanol (álcool de cadeia curta e muito hidrofílico) é capaz de solvatar os monômeros dos surfactantes, dificultando assim a micelização, o que leva a um aumento do valor da CMC. Por outro lado, a presença de etanol ou propanol, que possuem uma cadeia carbônica maior, diminui o valor CMC, favorecendo a

formação das micelas ao interagirem com a superfície micelar reduzindo a repulsão entre as cabeças iônicas dos monômeros dos surfactantes (López-Grío et al., 1998). A presença de ACN e o tetrahidrofurano provocam o mesmo efeito que o metanol, apesar das diferentes polaridades e estruturas.

Alcoóis mais hidrofóbicos como o butanol e o pentanol (de estrutura semelhante a um surfactante) podem penetrar na micela, com o grupo hidroxila orientado para a camada de Stern e cadeia não-polar, permanecendo inserida dentro do núcleo da micela. O resultado é uma micela inchada e mista. Isso não costuma ocorrer com alcoóis mais hidrofílicos, pois estes não penetram nas micelas.

Em resumo, a adição de um modificador orgânico no sistema pode incrementar interações entre soluto e a micela, solvatar a fase estacionária, diminuindo assim a quantidade de surfactante adsorvido, e alterar a rigidez da interação entre o surfactante e o grupo alquil da fase móvel. Esse efeito é mais significativo com o aumento da hidrofobicidade e com o aumento da concentração do modificador orgânico (López-Grío et al., 1998).

O comportamento de retenção de diversos solutos em MLC é dependente da concentração do modificador orgânico (López-Grío et al., 1998). Porém, vários outros fatores são importantes como a natureza e a concentração do surfactante, o pH da fase móvel, a força iônica do meio, a velocidade de fluxo da fase móvel, a afinidade do surfactante com o soluto, além da temperatura. Para explorar o máximo as vantagens da MLC é preciso compreender os mecanismos responsáveis pela retenção dos solutos nesse complicado sistema de interação soluto-fase móvel e fase móvel-fase estacionária, de forma que os experimentos de ajuste de condição de separação não sejam baseados simplesmente em termos empíricos (Momenbeik e Khorasani, 2006).

Os principais trabalhos em MLC têm focado nos estudos fundamentais sobre a adsorção do surfactante, comportamento de retenção, obtenção dos coeficientes de partição, evidências de mecanismo de retenção, melhora na eficiência do pico cromatográfico e seletividade. Muitos desses estudos foram realizados na década de 90. O conhecimento adquirido através desses estudos vem permitindo uma melhor descrição teórica de MLC e um melhor entendimento e uso da técnica (Ruiz-Ángel et al., 2009).

2.3.3

Mecanismo de Retenção em Cromatografia Líquida Micelar

Em cromatografia líquida, quando a fase móvel contém surfactantes que formam micelas, ocorre o aumento da complexidade nas interações comparado com o que normalmente acontece em cromatografia reversa convencional. A distribuição do analito na fase móvel micelar pode ocorrer de quatro possíveis formas, como citado. Os monômeros dos surfactantes iônicos são adsorvidos na fase estacionária por interação hidrofóbica, ou seja, a cauda da micela interage com o grupo alquil da fase estacionária reversa. Assim, a parte polar do surfactante estará voltada para fase móvel e para o analito, conforme mostrado na Figura 11 (García-Alvarez-Coque et al., 1997).

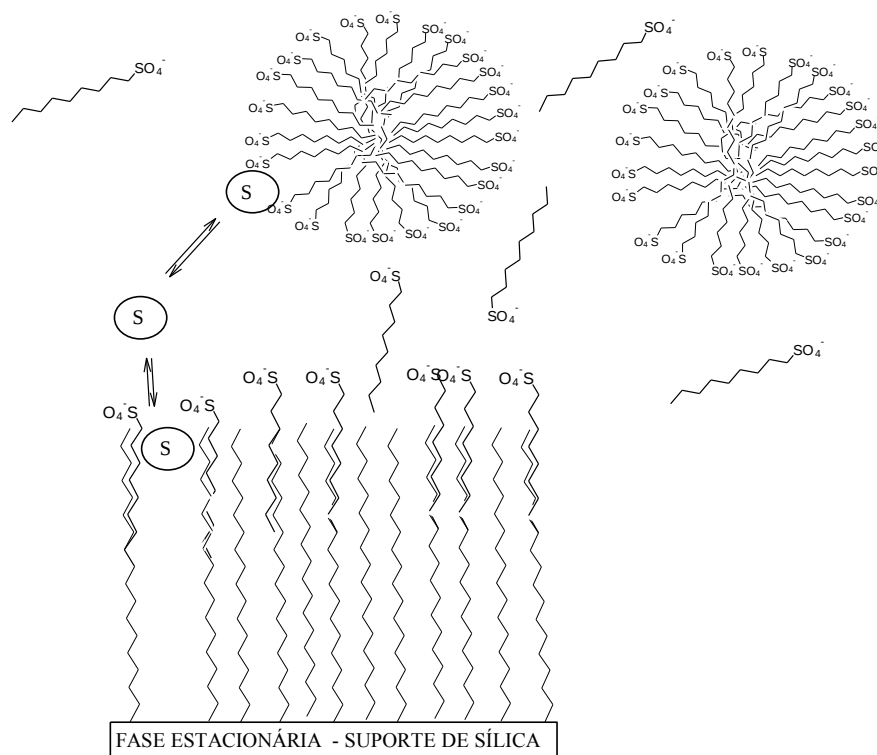


Figura 11. Representação esquemática do comportamento de retenção de um soluto, S, entre a coluna de fase estacionária ligada C18 modificada com SDS, a fase móvel aquosa e a fase móvel micelar (adaptado de Ruiz-Ángel, 2009).

A adsorção de surfactante na superfície das partículas da fase estacionária modifica drasticamente as características da coluna como sua polaridade, o volume do poro, a estrutura e área superficial. Estudos do comportamento de adsorção do SDS e do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em cinco tipos de

fases estacionárias (C3, C8, C18, cianopropil e sílica pura) mostraram que a fase C18 adsorve uma maior quantidade de SDS, e a fase sílica pura promove a menor adsorção de SDS. Dessa forma, pode se afirmar que esse surfactante se liga, preferencialmente, à fase estacionária através de ligações hidrofóbicas. Em relação ao CTAB, o comportamento foi similar ao do SDS, sendo que a saturação ocorreu quando a concentração do surfactante foi duas vezes maior que a CMC. Com a sílica pura ocorreu uma diferença em relação ao SDS, uma vez que a adsorção não foi significativa, evidenciando que as interações hidrofóbicas entre esse surfactante e a fase estacionária não foram preferenciais (Berthod et al., 1986 a)

As fases estacionárias com partículas de poros maiores, por permitirem uma melhor penetração das micelas, tendem a permitir melhor desempenho da separação por MLC, pois levam a eluição com menor tempo de retenção dos solutos. Por outro lado, fases estacionárias com poros pequenos, por efeito estérico e eletrostático, levam à exclusão micelar já que grupos silanóis repelem as micelas carregadas (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000, McCormick et al., 2000).

O comportamento de retenção depende das interações estabelecidas entre o soluto e a fase estacionária modificada e entre o soluto e as micelas presentes na fase móvel. Solutos neutros eluidos com surfactantes iônicos e não iônicos e solutos iônicos eluidos com surfactantes não-iônicos podem ser afetados por interações apolares, dipolo-dipolo e ácido-base. Além dessas interações, podem ocorrer interações eletrostáticas entre solutos iônicos e surfactantes iônicos, ou seja, entre os solutos e o surfactante adsorvido na fase estacionária e entre o soluto e a superfície carregada das micelas. Em qualquer um desses casos, o fator estérico pode ser importante. Em colunas com porosidade reduzida, estas interações podem ser prejudicadas (Ruiz-Ángel et al., 2009). As possíveis interações iônicas que podem ocorrer dentro do sistema cromatográfico acontecem entre o analito e a parte polar do surfactante ou entre o analito e os grupos silanóis livres da fase estacionária, sendo que esta última pode contribuir para uma baixa eficiência da técnica MLC com formação de frentes de pico que afetam sua simetria e menor eficiência. A interação entre os silanóis e o analito pode ser evitada com adição de pequena quantidade do reagente trietilamina ((Et)₃N, cuja fórmula molecular é (C₂H₅)₃N). Na faixa de pH usual das fases

móveis em HPLC (pH de 3 a 8) a $(Et)_3N$ tem carga positiva e interage com os silanóis residuais da fase estacionária, reduzindo os efeitos indesejáveis já citados no cromatograma obtido por MLC, além de melhorar a repetição dos tempos de retenção. Interações hidrofóbicas entre o soluto e a parte apolar do surfactante adsorvido e entre o soluto e os grupos alquila da amina ligada aos silanóis também podem ocorrer (Nawrocki, 1997).

Em suma, quando o soluto é carregado com carga oposta a do surfactante iônico ocorre atração entre o soluto e o surfactante, diminuindo assim o tempo de retenção do soluto. Se as cargas do analito e do surfactante iônico tiverem o mesmo sinal, poderá ocorrer uma repulsão eletrostática e o tempo de retenção do analito tenderá a ser maior. Porém, dependendo da estrutura do soluto de carga igual ao da micela iônica, este pode interagir com a parte hidrofóbica da micela e, desta forma, o seu tempo de retenção diminui com a elevação da concentração de surfactante. Para solutos apolares, poderão ocorrer apenas duas interações hidrofóbicas: i) entre o soluto e a micela e ii) entre o soluto e a fase estacionária modificada.

Em muitos trabalhos com cromatografia líquida existe a necessidade de ajustar o pH e, eventualmente, a força iônica da fase móvel. A adição de sais, por exemplo, pode alterar a quantidade de surfactantes iônicos adsorvidos na fase estacionária, devido à redução de interação eletrostática entre o sal e o surfactante (Berthod et al., 1986 b).

2.3.4

Coeficiente de Partição

Ao se adicionar uma substância em um sistema constituído por dois líquidos imiscíveis formando duas fases, esta irá distribuir-se entre os dois líquidos até que as concentrações da substância em cada uma das fases atinja a concentração de equilíbrio. A razão entre essas concentrações é a constante de distribuição, que também é chamada de constante de partição. Seguindo o mesmo princípio, na cromatografia líquida existe a partição de solutos entre as fases estacionária e móvel, sendo que nesse caso, o sistema é dinâmico já que a fase móvel percola pela fase estacionária.

Apesar do termo coeficiente de partição ainda é extensivamente utilizado em muitos artigos científicos de cromatografia, a IUPAC recomenda o uso do termo constante de distribuição ou razão de partição, simbolizado por K_D . Além disso, o termo razão de distribuição (D) não deve ser confundido com o K_D , já que a razão de distribuição é um valor empírico que pode variar com as condições experimentais, como ionização, precipitação e por reações químicas e não está necessariamente relacionada com o equilíbrio de distribuição de um soluto entre duas fases, e sim, com a distribuição do soluto, independentemente da sua forma química. Caso o soluto não sofra mudança na forma química, tem-se que $D = K_D$.

Considerando duas fases imiscíveis, uma fase orgânica e outra aquosa, o valor de K_D é dado pela razão das concentrações do soluto nas fases orgânica e aquosa. Por convenção, a concentração do soluto distribuído na fase orgânica é o numerador e a concentração do soluto na fase aquosa é o denominador, como apresentado na Equação 1.

$$A_{(org)} \rightleftharpoons A_{(aq)} \text{ onde } K_D = [A_{(org)}] / [A_{(aq)}] \quad (1)$$

O logaritmo do fator de retenção dos solutos, simbolizado por k , é linearmente correlacionado com o logaritmo da constante de distribuição, como descrito por Collander em 1951 (Equação 2) onde a e b são os coeficientes que são determinados pela medição dos fatores de retenção de um conjunto de solutos de K_D conhecidos numa coluna de cromatografia de fase reversa.

$$\log K_D = a \log k + b \quad (2)$$

A hidrofobicidade de um composto pode ser entendida como a preferência de um composto em permanecer na fase orgânica em vez da fase aquosa. Uma escala quantitativa pode ser estabelecida em que os comportamentos dos vários compostos são comparados no mesmo ambiente, para demonstrar a sua capacidade individual de participar de interações hidrofóbicas (García-Álvarez-Coque e Torres-Lapasió, 1999). O coeficiente de partição octanol-água, simbolizado por $P_{O/W}$, proposto por Hansch na década de 60 (Hansch, 1971), é um dos parâmetros que indica a hidrofobicidade de uma substância química, e é a

razão entre as concentrações do soluto, no equilíbrio, em um sistema constituído de água e octanol.

Devido à correlação entre o $P_{O/W}$ com outras propriedades físicas, químicas e biológicas das substâncias, esse coeficiente de partição tem servido para estimar fatores de bioconcentração, de toxicidade e de solubilidade (Berthod e Carda-Broch, 2004).

O tratamento cromatográfico envolvendo a fase móvel micelar deve explicar o comportamento de eluição do soluto em termos de certos parâmetros da coluna, das características micelares e as constantes de distribuição entre a fase estacionária e a fase aquosa (K_{SW}), fase estacionária e fase micelar (K_{SM}) e fase micelar e fase aquosa (K_{MW}), ou as constantes de equilíbrio, K , onde nos índices, S representa a palavra *stationary* (fase estacionária), W significa *water* (fase aquosa) e M representa *micelle* (fase micelar). Na Figura 12 o modelo das “três” fases, proposto por Armstrong e Nome (1981) em um sistema de MLC é mostrado, assim como as equações químicas que representam os três equilíbrios de partição existentes.

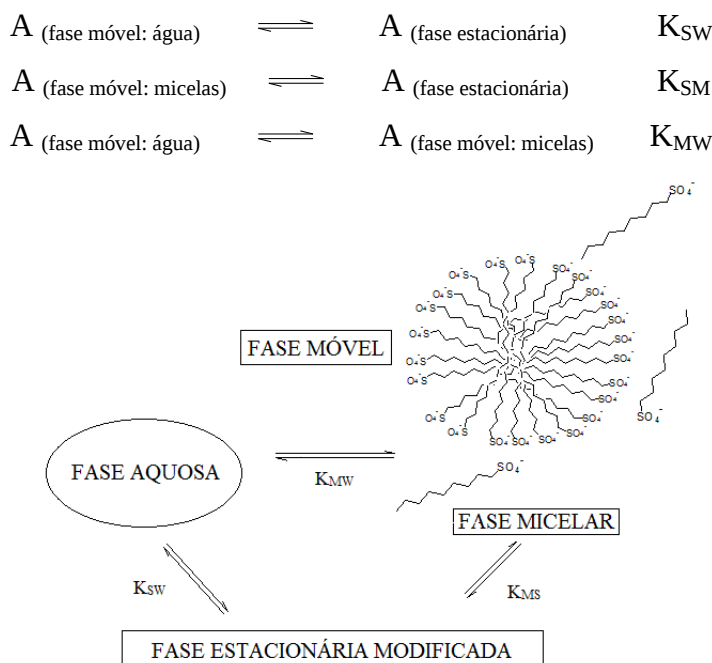


Figura 12. Representação esquemática dos três equilíbrios de partição que ocorrem na eluição de um soluto em MLC (adaptado de Khaledi, 1997).

A tendência de interação do soluto com a micela é geralmente expressa através da constante de ligação entre o soluto e a micela (do inglês *binding constant*) representado por K_{WM} , para a reação em equilíbrio (Equação 3) onde

[A] representa a concentração do soluto e [M] representa a concentração da micela (abaixo do valor da CMC).



A retenção de substâncias mais polares em MLC ocorre devido à partição do soluto entre a fase aquosa, a fase micelar e a fase estacionária (Figura 12), enquanto que a retenção para solutos pouco polares ocorre diretamente da partição entre a fase micelar e a fase estacionária. (Khaledi, 1997)

A constante de ligação K_{MW} que ocorre entre a fase micelar e a fase aquosa desempenha papel importante no tempo de retenção do analito e na seletividade na MLC (Khaledi, 1997). As constantes de ligação K_{WS} (partição entre fase aquosa-fase estacionária) e K_{WM} (partição entre fase aquosa-fase micelar) estão relacionados, respectivamente, com a interação do soluto na fase estacionária e na fase micelar, e possuem efeitos contrários na retenção do soluto. Para valores elevados de K_{WS} a retenção do soluto é alta, enquanto que para valores elevados de K_{WM} a retenção do soluto é reduzida devido à forte associação com as micelas (Borgerding et al., 1988; García-Alvarez-Coque et al., 1996).

De acordo com o comportamento de interação entre o soluto e a fase móvel micelar, os solutos são classificados em três categorias: *binding*, *nobinding* e *antibinding*. Os solutos ditos como *binding* (ligantes) são aqueles que interagem com as micelas e com o aumento da concentração do surfactante na fase móvel, seu tempo de retenção diminui. Na categoria *nobinding* (não ligantes) tem-se solutos que não se associam às micelas, logo seu tempo de retenção permanece inalterado na presença do meio micelar, isto é $K_{WM} = 0$. Já a categoria dos solutos *antibinding* (anti-ligantes) pode ser reconhecida pelo aumento do tempo de retenção do soluto quando há um aumento na concentração de surfactante na fase móvel. Uma das explicações para esse tipo de comportamento é a repulsão eletrostática que pode ocorrer entre os surfactantes e os solutos de mesma carga. Para esse tipo de soluto a retenção ocorrerá pela interação hidrofóbica entre o soluto e a fase estacionária (Armstrong e Stine, 1983).

Como o comportamento de retenção dos solutos *antibinding* é regido por interação eletrostática, é de se esperar que a adição de sais no sistema minimize a repulsão entre o soluto e a micela, podendo esse soluto, passar de *antibinding* para

nobinding e até mesmo se tornar *binding* pela adição crescente de sais no meio micelar. Este é o caso de solutos com alta hidrofobicidade para promover a associação com a parte apolar da micela, já que a interação eletrostática é minimizada pela adição de sais (Armstrong e Stine, 1983).

Em relação aos surfactantes iônicos, duas situações são possíveis de acordo com a carga do soluto e do surfactante: a repulsão ou a atração (tanto pela fase estacionária modificada quanto pela micela). No caso de repulsão eletrostática, os solutos carregados não irão ser retidos na fase estacionária modificada e apenas interações hidrofóbicas irão existir, porém mesmo estas não serão muito significativas, assim, os solutos são eluídos rapidamente. Em contraste, em situações onde há atração eletrostática e hidrofóbica, os tempos de retenção são mais elevados (Ruiz-Ángel et al., 2009).

2.3.5

O comportamento de retenção em MLC

O tempo de retenção em MLC é bem reprodutivo e pode ser modelado com razoável exatidão de modo a prever mudanças na retenção do soluto quando há variação na composição da fase móvel (concentração do surfactante e proporção do modificador orgânico) e do pH. Este conhecimento facilita a escolha das condições de separação, pois permite compreender os processos que ocorrem com o soluto no sistema cromatográfico (García-Alvarez-Coque et al., 1997; Ruiz-Ángel et al., 2002).

Dentre as diferentes equações empíricas reportadas na literatura, alguns modelos podem ser encontrados relacionando a retenção com: (i) a concentração do modificador orgânico (Armstrong e Nome, 1981; Arunyanart e Cline Love, 1984); (ii) a concentração do modificador orgânico e surfactante (Jiménez et al., 1996) e (iii) o pH e o concentração do modificador e do surfactante (Arunyanart e Cline Love, 1985).

A mudança nos tempos de retenção dos diferentes solutos varia com sua carga e hidrofobicidade, bem como dependem do tamanho da cadeia alquila, da carga e da concentração das micelas (Kord e Khaledi, 1992).

- **Fase móvel micelar pura**

Várias equações que relacionam o fator de capacidade, simbolizado por K , com a concentração das micelas na fase móvel, simbolizado por $[M]$, têm sido desenvolvidas para representar a retenção cromatográfica do soluto em MLC. Armstrong e Nome, em 1981, Arunyanart e Cline Love, em 1984 e Foley, em 1990, propuseram modelos que permitiriam medir a força de interação soluto-micela e soluto-fase estacionária em fase móvel micelar pura. Os modelos mostrariam uma relação linear entre o decréscimo do fator de retenção de solutos *binding* com o aumento da concentração das micelas. Em concentrações bastante elevadas do surfactante, o soluto *binding* tende a eluir próximo ao volume morto (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Armstrong e Nome (1981) propuseram uma equação que relaciona o volume de eluição do soluto em MLC com a concentração do surfactante micelizado na fase móvel. O modelo permite o cálculo das constantes de ligação para solutos não ionizáveis, porém não é possível prever o comportamento de eluição de solutos ionizáveis em diferentes valores de pH, como pode ser visto na Equação 4, onde V_s é o volume da superfície ativa da fase estacionária; V_e representa o volume total de fase móvel necessário para eluir um dado soluto na coluna; V_0 é o volume extra-coluna, conhecido também como volume morto; ϕ é a razão V_s/V_0 ; v é o volume parcial específico dos monômeros dos surfactantes na micela ($0,246 \text{ L mol}^{-1}$ para SDS) e $[M]$ é a concentração total do surfactante menos CMC.

$$\frac{V_s}{(V_e - V_0)} = \frac{\Phi}{k'} = \left(\frac{v(K_{mw} - 1)}{K_{sw}} \right) [M] + \frac{1}{K_{sw}} \quad (4)$$

Idealmente existe uma relação linear entre $V_s/(V_e - V_0)$ em função de $[M]$, onde pela equação da reta é possível encontrar o valor do intercepto, que é $1/K_{sw}$, e a inclinação da reta, que é $v(K_{MW} - 1)/K_{sw}$. O valor de v é facilmente encontrado na literatura especializada.

Os autores assumiram que a constante de ligação, K_{SM} , que descreve a transferência direta do soluto-micela para a fase estacionária, é mínima e, por isso, ele não foi considerado no modelo. Porém, tecnicamente, o valor de K_{MW} é a

constante de partição entre a micela e a água por monômero de surfactante. Para obter o valor correto da constante de ligação entre a micela e a água basta multiplicar o K_{MW} pelo número de agregação da micela.

Quando não há a presença da fase micelar no sistema cromatográfico a Equação 4 se reduz a Equação 5.

$$V_e = V_0 + V_s K_{WS} \quad (5)$$

O modelo proposto por Cline Love e Arunyanart (1984) (Equação 6) relaciona o fator de retenção com a concentração do surfactante micelizado. Os autores assumiram o equilíbrio de interação entre o soluto na fase aquosa e os sítios de ligação na fase estacionária, que é regido pela constante de equilíbrio de partição simbolizada por K_{AS} . O segundo equilíbrio de partição ocorre entre o soluto na fase móvel aquosa e o surfactante micelizado, simbolizado por M , formando o complexo AM , onde a constante correspondente é simbolizada por K_{AM} . O terceiro equilíbrio de associação que envolve a transferência do soluto (presente no complexo soluto-micela ou AM) para os sítios da fase estacionária, formando o complexo AS , foi negligenciado no desenvolvimento dessa equação. Entende-se que o fator de retenção é regido apenas pelos dois primeiros equilíbrios, K_{AS} e K_{AM} . A Equação 6 mostra a relação hiperbólica entre o fator de retenção e as constantes de ligação e a concentração das micelas.

$$k = \Phi \frac{[AS]}{[A] + [AM]} = \frac{\Phi K_{AS} [S]}{1 + K_{AM} [M]} \quad (6)$$

Vale ressaltar aqui o esclarecimento sobre as diferenças entre as simbologias adotadas para descrever o equilíbrio de partição entre as três fases. García-Alvarez-Coque e Berthod (2000) denomina a constante de equilíbrio que ocorre entre a fase aquosa e a fase estacionária como K_{AS} , onde a letra A simboliza que o analito é proveniente da fase aquosa. Assim, a constante K_{AM} indica a transferência do analito da fase aquosa para a fase micelar. Tais equilíbrios foram simbolizados por Armstrong, respectivamente, por K_{WS} e K_{WM} , como visto ao longo desse texto.

A Equação 6 pode ser manipulada para tornar a relação entre $1/k$ e $[M]$ linear. Para tal, eleva-se ambos os lados da equação pelo expoente -1, resultando na Equação 7, forma da equação da reta, de onde os coeficientes angular e linear levam aos valores de K_{AM} e K_{AS} .

$$1/k = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}[M]}{K_{AS}} = c_0 + c_1[M] \quad (7)$$

Por fim, o modelo de Foley (1990), se baseia na ideia de que o fator de retenção pode ser tratado como um parâmetro aparente, onde a associação entre o soluto e a micela seria um equilíbrio secundário que afeta o fator de retenção do soluto não associado às micelas, simbolizado por k_0 . A Equação 8 é bastante similar à Equação 4 e Equação 6.

$$k = k_0 \frac{1}{1 + K_{AM}[M]} \quad (8)$$

O fator de retenção do soluto livre coincide com ϕK_{SW} da Equação 4 e o K_{AS} da Equação 6. O K_{AM} da Equação 8 tem o mesmo conceito da constante K_{AM} da Equação 6 e corresponde ao produto $v(1 - K_{WM})$ proveniente do modelo de Armstrong e Nome (1981).

As equações propostas por Armstrong e Nome, Arunyanart e Cline e Love têm sido extensivamente utilizadas em vários trabalhos envolvendo diversos tipos de compostos (não-polares, polares, neutros e iônicos), surfactantes (aniônicos, catiônicos e não-iônicos), fases estacionárias (C8, C18 e ciano) e modificadores orgânicos que permitiram verificar a validade desses modelos no cálculo das constantes de associação soluto-micela (Jiménez e Marina, 1997).

Algumas suposições foram feitas para desenvolver os modelos apresentados anteriormente que descrevem a retenção: i) o valor da CMC não é afetada pela adição de pequenas quantidades de soluto no sistema cromatográfico; ii) a saturação da fase estacionária, pelo surfactante, ocorre antes de se alcançar a CMC; iii) o número de agregados ou a geometria das micelas não será alterada com o aumento da concentração do surfactante; iv) complexo soluto-micela possui estequiometria 1:1.

Quando essas suposições não são válidas podem ocorrer desvios no comportamento de retenção, como a não linearidade da relação $1/k$ em função de $[M]$. Além disso, a Equação 4, Equação 7 e Equação 8 foram desenvolvidas para cálculo da retenção de solutos neutros ou com carga oposta ao do surfactante (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Para solutos repelidos pelas micelas e que não são capazes de se associarem a fase estacionária, o tempo de retenção aumenta com o aumento da concentração do surfactante. Isto implica em um valor para K_{AM} negativo, o que do ponto de vista químico é impossível. Porém, esse valor pode ser usado para quantificar o grau de repulsão eletrostática entre o soluto e a micela (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Jandera e Fisher (1996) reportaram as limitações dessas equações para modelar o tempo de retenção dos solutos *antibinding*. Para incluir o efeito da retenção, estes autores propuseram que parte da fase estacionária seja inacessível a estes solutos. A redução relativa do volume acessível será proporcional à quantidade de surfactante adsorvido, simbolizado por Q_{CMC} , o qual é constante em relação à CMC. Similarmente, uma fração do volume da fase móvel não poderá participar das interações com o soluto.

O fator de retenção dos solutos associados à micela e repelidos pelos monômeros dos surfactantes adsorvidos na fase estacionária, pode ser modelado pela Equação 9 descrita abaixo.

$$k = \frac{\Phi K_{AS}}{1 + K_{AM}[M]} (1 - f_s Q_{CMC}) \quad (9)$$

Para solutos repelidos tanto pela fase estacionária quanto pela fase móvel micelar, o fator de retenção pode ser descrito pela Equação 10, onde f_s e f_m são, respectivamente, as frações da fase estacionária e da fase móvel inacessíveis ao soluto. Similarmente, a Equação 10 pode ser obtida quando não houver repulsão pela fase estacionária, isto é, $f_s = 0$.

$$k = \Phi K_{AS} \frac{1 - f_s Q_{CMC}}{1 - f_m[M]} \quad (10)$$

Para alguns compostos a relação entre $1/k$ em função de $[M]$ ou entre $V_s/(V_e - V_0)$ em função de $[M]$ gera um intercepto negativo ($1/K_{SW}$), o que leva a impossibilidade de calcular o coeficiente de partição K_{SW} e K_{MW} (Arunyanart e Cline Love, 1984). Segundo Borgerding et al. (1988) esse efeito não é causado por erros experimentais. Na verdade, se for considerado o erro, o intercepto estaria próximo de zero, ou seja, o valor de K_{SW} seria muito grande enquanto que a constante recíproca K_{WS} seria muito pequena. Os compostos que apresentam o intercepto negativo possuem alta massa molecular e são insolúveis em água, como é o caso do perileno ($C_{20}H_{10}$) e do etilbenzeno (C_8H_{10}). Isto significa que os solutos bastante hidrofóbicos, que possuem solubilidade muito limitada em água, terão seus tempos de retenção definidos pela transferência direta do soluto-micela para a fase estacionária. Assim, o erro associado ao cálculo da constante de associação cresce com o aumento da hidrofobicidade do soluto. Logo, o cálculo do fator de retenção para estes compostos pode ser feito com o auxílio da Equação 11, onde a inclinação depende do coeficiente de partição entre a fase estacionária e a micela e o intercepto é igual a zero (Borgerding et al., 1988).

$$k = K_{sm} \frac{\Phi}{v[M_m]} \quad (11)$$

Outros autores, como Torres-Lapasió et al., reportaram que encontrar um valor negativo intercepto decorre de problemas no cálculo do tempo morto quando a fase micelar é utilizada, além de outros erros advindos do experimento como o número de agregados, a variação da CMC e a geometria da micela, (Jiménez e Marina, 1997).

- **Fase móvel micelar híbrida: adição de modificador orgânico**

A fase móvel micelar sem modificadores orgânicos é muito pouco usada em MLC, porém as equações para prever o tempo de retenção dos solutos nessa fase serviram de base para a modelagem de novas equações para a fase móvel micelar híbrida (fase móvel composta por micelas, água e solvente orgânico). A principal função da adição de modificadores orgânicos em MLC é o aumento da eficiência da separação. A presença de modificadores orgânicos auxilia na

transferência de massa entre as micelas e a fase estacionária, altera a CMC do surfactante e o tempo de retenção dos solutos em MLC. Na maioria dos casos, isso é consequência da penetração de, por exemplo, alcoóis dentro da micela e pela diminuição da polaridade da fase móvel. Além desses fatores, existe uma competição entre o modificador orgânico e o surfactante para ser adsorvido pela fase estacionária, o que leva à diminuição da camada de surfactante, alterando o tempo de retenção dos solutos (Jiménez et al., 1996). Dessa forma, as constantes de ligação entre o soluto e a fase estacionária, K_{AS} , e entre o soluto e a fase micelar, K_{AM} , também diminuem. Como, a redução de K_{AS} é muito maior que a de K_{AM} , ocorre um aumento na razão K_{AM}/K_{AS} , aumentando a força de eluição da fase móvel (Equação 7).

Para uma dada concentração de surfactante e modificador orgânico, o número de moléculas de álcool introduzidas dentro da micela por molécula de surfactante pode ser calculado usando a constante de distribuição do álcool entre a micela e a água (K_{MW}) e o volume molar específico do surfactante (v) (López-Grió et al., 1998).

López-Grió et al. (1998) investigou a influência da adição de modificadores na fase móvel micelar e desenvolveram um modelo para o cálculo da quantidade de alcoóis introduzidos nas micelas, descrito na Equação 12, onde, n_a é o número total de mols de alcoóis e $n_m^{a/s}$ é o número de mols de alcoóis por mol de surfactante.

$$n_m^{a/s} = n_a P_{MW} v_s / [1 - [M] v_s + P_{MW} [M] v_s] \quad (12)$$

De acordo com a Equação 12, como esperado, a razão entre a quantidade de álcool presente na fase micelar e a quantidade de surfactante (ambas em mol) depende da concentração do surfactante. Quando a razão está acima de 3, significa que as moléculas de alcoóis comprometerão a integridade das micelas (López-Grió et al., 1998). Assim, o efeito do modificador orgânico na retenção depende da razão entre a concentração deste e a concentração de surfactante, sendo o resultado diferente para cada soluto em termos de ganho na seletividade (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Em contraste com a fase hidro-orgânica da cromatografia de fase reversa convencional, na MLC o aumento da força da fase móvel não diminui a

seletividade. Quando o comportamento do soluto é *binding*, o aumento da concentração da micela eleva a força da fase móvel, de acordo com a Equação 6. O ganho na seletividade é atribuído aos equilíbrios de ligação competitivo no sistema MLC e/ou pela característica das micelas de compartimentalizar solutos e solventes orgânicos.

Kord e Khaledi (1992), em seus experimentos com força iônica e seletividade, observaram que o aumento da concentração de micelas na fase móvel híbrida provoca um efeito oposto em termos da seletividade quando comparada com o efeito causado pelo aumento da concentração de solvente orgânico. Esta observação sugere que embora a força da fase móvel aumente com a elevação da concentração de micelas e do solvente orgânico, existe uma competição entre ambos pelo soluto o que provoca um efeito mútuo de um e do outro no controle da seletividade e da retenção.

A Equação 13, desenvolvida por Kord e Khaledi (1992), é derivada da logarítmica da Equação 7 para a avaliação da força de eluição do solvente orgânico.

$$\log k = \log K_{AS} - \log(1 + K_{AM}[M]) \quad (13)$$

Assumindo uma relação linear entre $\log k$, $\log K_{AS}$ e $\log(1 + K_{AM}[M])$ com a fração de volume de solvente orgânico, simbolizado por φ , os autores obtiveram a Equação 14, Equação 15 e Equação 16 a seguir, onde, k_0 , $K_{AS,0}$ e $K_{AM,0}$ são parâmetros associados à fase móvel micelar pura (na ausência de solvente orgânico), S_{hyb} está relacionado a força de eluição na fase móvel micelar, e S_s e S_m representam, respectivamente, a sensibilidade às variações da partição do soluto advindo do solvente para a fase estacionária e do solvente para as micelas com mudanças em φ (Kord e Khaledi, 1992).

$$\log k = \log k_0 - S_{hyb}\varphi \quad (14)$$

$$\log K_{AS} = \log K_{AS,0} - S_s\varphi \quad (15)$$

$$\log(1 + K_{AM}[M]) = \log(1 + K_{AM,0}[M]) - S_m\varphi \quad (16)$$

Na Equação 17, o sinal negativo mostra a natureza competitiva de dois equilíbrios de partição (na fase estacionária e na fase micelar). Na ausência de micelas, S_{hyb} é igual a S_s , ou seja, S_{hyb} será igual à força de eluição em fase móvel hidro-orgânica da cromatografia convencional.

$$S_{hyb} = S_s - S_m \quad (17)$$

Usando alcoóis como modificadores de micelas de SDS e CTAB, o valor de S_{hyb} varia de acordo com o álcool utilizado, na seguinte ordem: $S_{pentanol} > S_{butanol} > S_{propanol} > S_{metanol}$. Essa ordem coincide com a da força da fase móvel hidro-orgânica para o sistema de cromatografia convencional. A mudança de solvente orgânico—provocará mudanças específicas na força de eluição e na seletividade da fase móvel micelar, além do aumento da capacidade de resolução dos picos cromatográficos, o que melhora a eficiência da análise. Curiosamente, há pouco mais de 12 anos apenas, a ACN tem sido usada em MLC e tem se mostrado bastante eficiente no que diz respeito à resolução dos picos. Este fato ocorre, provavelmente, devido à sua baixa força de eluição (Ruiz-Ángel et al., 2009; López-Grió et al., 2001).

Ruiz-Ángel e colaboradores (2002) examinaram a capacidade de se resolver picos com MLC, avaliando várias séries de solutos de diferentes graus de polaridade, utilizando como fase estacionária o C18. Em todos os casos, os compostos com grande variedade de polaridade tiveram seus picos muito bem resolvidos e com tempos de análise relativamente curtos utilizando pequena fração de volume de modificadores orgânicos. Para cada série de solutos, de acordo com os seus respectivas constantes de partição, foi estudado o efeito da natureza e da porcentagem de modificador (propanol, butanol, pentanol, metanol e ACN). Surpreendentemente, os picos foram melhor distribuídos no cromatograma obtido por MLC quando comparado com o obtido por cromatografia convencional de fase reversa. A retenção diminuiu em maior extensão para os solutos hidrofóbicos quando se aumentou a concentração do modificador orgânico. Esse comportamento é similar ao obtido com a da eluição por gradiente em cromatografia convencional.

Por outro lado, o uso de gradiente de eluição em MLC pode ser vantajoso na separação de misturas de compostos com grande variedade de polaridades, uma vez que a fase estacionária modificada pelo surfactante mantém sua composição constante durante o processo de gradiente de concentração micelar, sendo apenas necessário reequilibrar o sistema cromatográfico com a composição inicial da fase móvel antes da próxima corrida cromatográfica. A previsão da retenção em condições de gradiente em MLC foi desenvolvida por Snyder, que assumiu que o efeito causado pela mudança da concentração do surfactante guarda uma relação linear com a mudança da retenção (García-Alvarez-Coque et al., 1997).

Em MLC, a eluição por gradiente pode ser realizada pelo aumento da concentração de micelas e/ou concentração do modificador orgânico durante a corrida. A composição da fase estacionária (que é modificada pelos monômeros livres) irá permanecer a mesma durante o gradiente de concentração de micelas, não sendo necessário o reequilíbrio da coluna após cada corrida (Madamba-Tan et al., 1994).

Madamba-Tan et al. (1994) relataram que o gradiente de solvente orgânico pode modificar a composição da fase estacionária modificada, uma vez que proporcionam a dessorção dos monômeros da fase estacionária dependendo da concentração do aditivo. Porém, eles observaram que, limitando a concentração máxima do modificador (por exemplo, em 3 a 15% de propanol) não ocorre distúrbio do equilíbrio da coluna.

Pela Equação 18 pode-se observar que a relação entre a concentração do surfactante, $[M]$, e o volume do solvente orgânico, V , é linear, onde b é o coeficiente angular e a a concentração inicial de M (Madamba-Tan et al., 1994).

$$[M] = a + bV \quad (18)$$

A previsão do tempo de retenção em MLC em condições de gradiente de fase móvel tem sido baseado na teoria desenvolvida por Snyder, assumindo o modelo linear da Equação 7, sendo a correlação existente entre o modificador orgânico e concentração de micelas da Equação 18. Dessa forma, obtém-se a Equação 19, onde t_g é o tempo de retenção por gradiente, t_0 é o tempo morto, V_0/t_0 é a taxa de fluxo, k'_0 é o fator de capacidade do soluto na fase móvel inicial, e t_D é o tempo necessário antes do gradiente atual alcançar o topo da coluna. Esse

modelo tem apresentado uma boa correlação para uma grande variedade de solutos e para a variação da concentração de SDS na faixa de 0,1 a 0,5 mol L⁻¹ (García-Alvarez-Coque et al., 1997).

$$t_g = \frac{t_0 K_{AS}}{K_{AM} b V_0} \left(-\frac{1}{k_0'} + \sqrt{\left(\frac{1}{k_0'} \right)^2 + 2 \frac{K_{AM} b V_0}{K_{AS}} \left(1 - \frac{t_D}{t_0 k_0'} \right)} \right) + t_0 + t_D \quad (19)$$

• **Fase móvel micelar híbrida: efeito do pH sobre a retenção**

A retenção de ácidos orgânicos fracos e bases orgânicas fracas é afetado pelo pH da fase móvel. Pequenas mudanças no pH podem alterar significativamente o comportamento de retenção, principalmente quando o valor do pH da fase móvel for próximo da constante de ionização, simbolizado por K_H . Para se entender melhor o mecanismo de retenção e planejar a análise cromatográfica por MLC, deve-se conhecer o valor do K_H dos solutos no meio micelar (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

A interação dos ácidos e bases com agregados micelares induzem significativamente a mudança do pK_a que pode ser racionalizada em termos de partição das espécies e contribuições eletrostáticas (incluindo o efeito da adição de sais). Quando as espécies participantes do equilíbrio de ionização de um ácido fraco HA (Equação 20) se distribuem entre a fase aquosa e a pseudofase micelar, a constante de ionização aparente, simbolizado por K_H^{app} , pode ser expressa conforme a Equação 21, onde K_{HAM} e K_{AM} são, respectivamente, as constantes de ligação das espécies protonada e desprotonada com a micela (Pelizzetti e Pramauro, 1985).



$$K_H^{app} = K_H [(1 + K_{HAM}[M]) / (1 + K_{AM}[M])] \quad (21)$$

Na Figura 13 são apresentados os equilíbrios químicos que podem ocorrer, em maior ou menor grau, nas análises de compostos ionizáveis. A retenção do soluto é governada por dois equilíbrios de partição.

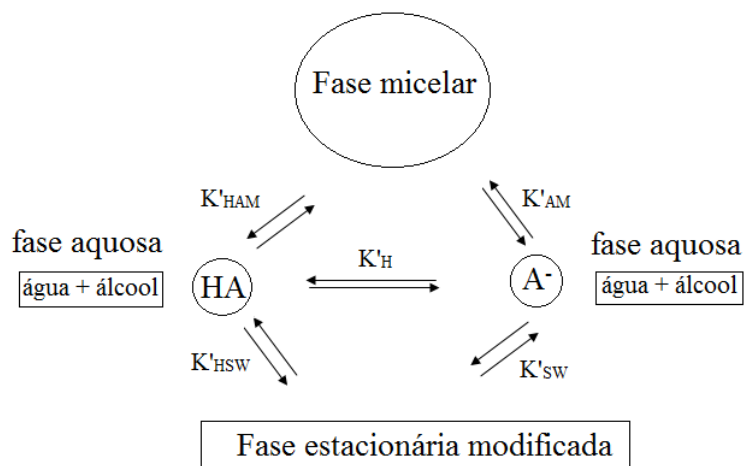
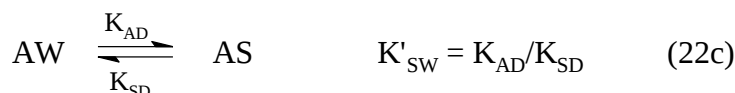
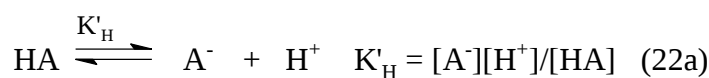


Figura 13. Equilíbrio de distribuição do soluto-micela e soluto-fase estacionária na fase móvel micelar com modificador orgânico (adaptado de García-Alvarez-Coque, 1997).

García-Alvarez-Coque, além de considerar que o soluto tem propriedades ácido-base, introduziu mais um fator que é a alteração dos equilíbrios das três fases pela presença de um modificador orgânico, simbolizado por D.

Na Figura 13, o primeiro equilíbrio se refere à distribuição do soluto entre a micela e a fase móvel aquosa. O segundo é a distribuição que ocorre entre a fase estacionária modificada e a fase móvel. O terceiro e último é o da transferência direta do soluto proveniente da micela para fase estacionária. O último equilíbrio pode ser negligenciado para solutos que possuem afinidade pela fase móvel aquosa, exceto para os compostos muito apolares. Os equilíbrios químicos propostos por García-Alvarez-Coque et al. (1997) foram traduzidos nos termos moleculares na Equação 22, onde, K_{AD} e K_{MD} medem a variação relativa da concentração do soluto na fase aquosa e na fase rica em micelas, respectivamente, na presença de um modificador orgânico, em comparação com uma fase rica em micelas pura (sem modificador) (Collado-Sánchez et al., 2010).



Os modelos matemáticos descritos previamente para o cálculo dos fatores de retenção (k) para solutos neutros podem ser estendidos para solutos ionizáveis. As interações das formas protonadas HA e das formas dissociadas A^- com a fase estacionária, S, e o surfactante na micela, M, formarão os complexos HAS, HAM, HAW, AS, AM e AW (Arunyanart e Cline Love, 1985).

As interações de solutos ionizáveis com a fase estacionária modificada e com as micelas deslocam o equilíbrio ácido-base na fase móvel. As reações ácido-base são processos secundários que modificam as interações que ocorrem dentro do sistema cromatográfico. Mudanças no comportamento ácido-base e na retenção de solutos ionizáveis podem ser observadas em surfactantes iônicos e não-iônicos. O efeito mais pronunciado na retenção é a interação eletrostática entre o soluto, a fase estacionária modificada e as micelas (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Para ácidos fracos eluidos em sistema com SDS (surfactante aniônico), o maior e o menor tempo de retenção ocorrem, respectivamente, em meio ácido, onde as espécies neutras são dominantes e em meio básico, onde espécies aniônicas (desprotonadas) prevalecem, levando à repulsão eletrostática.

Para bases fracas, a espécie catiônica protonada será mais retida em pH mais baixo do que as espécies neutras. O decréscimo do tempo de retenção em função do valor do pH da fase móvel sugere que a interação dos solutos com a superfície da fase estacionária carregada negativamente (modificada com SDS) é o fator dominante.

Em MLC com SDS, a dependência do valor de k em relação ao pH de ácidos e bases fracas tem forma sigmoide descendente, isto é, a retenção diminui

com o aumento do pH. Para sistemas que utilizam o CTAB (surfactante catiônico), tais curvas são ascendentes (Ruiz-Ángel et al., 2009). O aumento do tempo de retenção, em fase móvel com valores de pH mais baixos, pode ser atribuído ao fato de que os solutos interagem mais fortemente com a superfície da fase estacionária modificada, do que na fase móvel micelar (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

Para solutos monopróticos, a constante de protonação aparente, em sistema cromatográfico convencional de fase reversa, pode ser determinada pela medida do valor de k com a variação de pH (Equação 23), onde k_A e k_{HA} , respectivamente, são fatores de retenção das espécies básicas e ácidas, K_H é a constante de protonação na fase móvel, e $[H^+]$ a concentração hidrogeniônica (Ruiz-Ángel et al., 2009).

$$k = \frac{k_A + k_{HA}K_H[H^+]}{1 + K_H[H^+]} \quad (23)$$

A magnitude da mudança do valor de K_H deve ser maior para os analitos que possuem maior interação com a fase estacionária modificada. O valor de K_H também diminui com o aumento da concentração de solvente orgânico no meio micelar. Isto ocorre devido à modificação da constante termodinâmica em misturas de solventes aquosos e orgânicos e devido ao deslocamento do equilíbrio ácido-base advindo de mudança da interação soluto-micela na presença do modificador (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

O valor de pH da fase móvel utilizada em cromatografia com fases estacionárias com suporte de sílica é limitado entre 3,0 e 8,0. Este fato pode ser um problema na separação de ácidos e bases que possuem o valor de K_H próximo a esses valores limites de pH. O decréscimo da força ácida dos solutos em meio micelar (aumento positivo no $\log K_H$) amplia a faixa de pH onde as espécies ácidas são mais dominantes, resultando em três vantagens. A primeira delas é o fato de a máxima retenção da espécie protonada (k_{HA}) ser observada dentro do limite de operação das colunas à base de sílica. A segunda vantagem é o maior tempo de vida das colunas quando se trabalha com valores entre os limites superiores e inferiores de pH, o que leva a resultados reprodutíveis, desde que o pH da fase móvel esteja abaixo do pK_a da espécie, onde apenas uma forma

predomina. E, finalmente, cada composto em uma mistura comporta-se de maneira distinta para variações de surfactantes e modificadores orgânicos, resultando em valores diferentes de K_H dos compostos eluídos em fase móvel rica em micelas contribuindo assim para o aumento da seletividade (Ruiz-Ángel et al., 2009).

Em função da concentração micelar e do pH, colunas de fase ligada com ciano e C18 interagem de forma diferente com os monômeros dos surfactantes, resultando em um comportamento de eluição específico para espécies orgânicas ácidas e bases fracas. Por exemplo, os analitos aniônicos são eluídos rapidamente em C18 modificado com SDS, devido à repulsão eletrostática tanto da fase estacionária modificada quanto da micela na fase móvel (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

O fator de retenção em um sistema de cromatografia micelar é descrito como (Equação 24), onde [AS], [A], [AM] são as concentrações das espécies básicas e [HAS], [HA], [HAM] são das espécies ácidas.

$$k = \Phi \frac{[AS] + [HAS]}{[A] + [HA] + [AM] + [HAM]} \quad (24)$$

Substituindo as concentrações pelas respectivas equações de equilíbrio, temos a Equação 25, onde K_{HAS} e K_{HAM} são as constantes aparentes da protonação do soluto ligado, respectivamente, a fase estacionária e a fase micelar, ou seja, às micelas.

$$k = \frac{K_{AS} + K_{HAS} K_H [H^+]}{1 + \frac{((K_{AM} + K_{HAM} K_H [H^+])}{(1 + K_H [H^+]) [M]}} = \frac{K_{AS}^H}{1 + K_{AM}^H [M]} \quad (25)$$

• O tempo morto em MLC

A obtenção de um valor confiável do valor de k requer uma determinação exata do tempo morto no sistema cromatográfico. Porém, quando a fase móvel

micelar é usada, mudanças na camada de surfactante adsorvido na fase estacionária tornam imprevisíveis o formato e a intensidade das perturbações que aparecem no início do cromatograma, especialmente quando a composição da solução da amostra introduzida é muito diferente da fase móvel (Torres-Lapasió et al., 1996).

Segundo Torres-Lapasió et al. (1996), em muitos trabalhos com MLC se mede o tempo morto pela adição de água, de solução aquosa salina (NaNO_3 , NaI , KI) ou ainda com solventes orgânicos, tais como metanol ou ACN. Porém, recomenda-se que o tempo morto seja medido pelo máximo do pico de uma substância que não possui interação com a fase estacionária, e cuja interferência dos solventes orgânicos e sais na composição da fase estacionária modificada já tenha sido estudada.

O critério aplicado para determinar o tempo morto é a posição (ou tempo) do máximo do primeiro pico da perturbação na linha base, a partir da introdução da amostra. O primeiro critério é bastante simples, porém a variabilidade da forma e posição do primeiro pico com fases móveis de composições variadas leva a valores imprecisos. Em contrapartida, medir o tempo do início do primeiro pico principal no cromatograma é bastante reproduzível.

A medição do tempo morto através da introdução de água não é muito reproduzível, especialmente quando os dados são medidos no máximo da primeira perturbação da linha de base. Essa medição é melhor realizada quando feita por introdução de solução micelar (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

Para se determinar constantes físico-químicas é requerido um valor de tempo morto com maior exatidão, caso contrário, os valores de k podem ser negativos. Porém, quando o tempo de retenção estimado é usado apenas para prever a posição dos picos cromatográficos, o valor do tempo morto pode ser aproximado.

2.3.6

Causas e remediação da baixa eficiência da MLC

Uma das desvantagens da MLC em relação à cromatografia convencional de fase reversa é a baixa eficiência que resulta em picos cromatográficos largos.

Armstrong et al. (1986), Dorsey et al. (1983) e Borgerding e Hinze (1985) atribuem isso à lenta transferência de massa de soluto entre as micelas e a fase estacionária modificada que é, muitas vezes, decorrente da alta viscosidade da fase móvel rica em micelas. A principal diferença entre a fase móvel convencional e a micelar é a adsorção do surfactante na fase estacionária, sendo este fator apontado como motivo pela menor eficiência da MLC. Para atenuar esse problema, duas propostas foram apresentadas: (i) adição de pequena quantidade de propan-2-ol para diminuir a quantidade de surfactante adsorvido na fase estacionária e (ii) aumento da temperatura da coluna para diminuir a viscosidade (Berthod, 1997).

O aumento da temperatura da coluna também leva a um aumento da eficiência dos picos (efeito cinético) devido ao aumento da taxa de transferência de massa de soluto. Por outro lado, maiores temperaturas podem provocar efeitos indesejáveis, tais como a decomposição da amostra ou degradação da fase móvel micelar, formação de bolhas, deslocamento do equilíbrio cromatográfico e aumento da solubilidade da sílica. A avaliação da assimetria do pico pode indicar que o aumento da temperatura está sendo prejudicial no processo de separação (Momenbeik e Khorasani, 2005).

• **Processo cromatográfico e eficiência**

A qualidade do cromatograma depende de processos termodinâmicos (tempo de retenção) e cinéticos (eficiência de pico). A termodinâmica do processo cromatográfico é responsável pela retenção do soluto. O volume de retenção, simbolizado por V_R , está relacionado com a constante de afinidade do soluto pela fase estacionária, K (Equação 26) e o valor de k , sendo expresso na Equação 27.

$$V_R = V_0 + KV_S \quad (26)$$

$$k = (V_R - V_0) / V_0 = K\phi \quad (27)$$

O volume de retenção V_R e o valor de k são parâmetros que dependem da termodinâmica, logo, dependentes da temperatura. Dessa forma a equação clássica

da energia livre de Gibbs pode ser combinada com a Equação 27 para se obter a Equação 28 (equação de Van't Hoff).

$$\ln k = -\Delta H^0/R + \Delta S^0/R + \ln \phi \quad (28)$$

Se a variação de entropia padrão (ΔS^0) e a variação de entalpia padrão (ΔH^0) forem constantes na faixa de temperatura de trabalho, a relação entre $\ln k$ em função de $1/T$ será linear. Variações desses parâmetros indicariam uma mudança no mecanismo cromatográfico com a temperatura (Berthod, 1997).

A cinética do processo está ligada à eficiência do pico. O número de pratos teóricos (N), que é uma medida da eficiência da coluna, é melhor estimado usando a equação de Foley-Dorsey (Equação 29) quando a forma do pico simétrico for a de uma distribuição Normal, onde t_R é o tempo de retenção do soluto, $w_{0,1}$ é a medida da largura do pico a 10% da altura, B/A é a medida da assimetria do pico.

$$N = \frac{41,7(t_R/w_{0,1})^2}{(B/A)_{0,1}^2 + 1,25} \quad (29)$$

Pelo fato da Equação 29 levar em conta a assimetria do pico, que é um indicativo da perda da qualidade de separação. Quanto maior a eficiência da coluna, mais próximo da unidade é a razão B/A (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000). De acordo com Snyder e Kirkland, a contribuição pelo alargamento do pico cromatográfico pode ser representado pela Equação 30 onde os valores de C são coeficientes constantes da altura do prato teórico, relacionados com a difusão de Eddy (C_e), transferência de massa da fase móvel (C_m), difusão longitudinal (C_d), transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel (C_{sm}) e transferência de massa da fase estacionária (C_s). A camada delgada da fase estacionária é simbolizada por ϕf , onde D_m é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel, D_s é o coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária e u é a velocidade da fase móvel.

$$H = C_e d_p + \frac{C_m d_p^2 u}{D_m} + \frac{C_d D_m}{u} + \frac{C_{sm} d_p^2 u}{D_m} + \frac{C_s \Phi_f^2 u}{D_s} \quad (30)$$

A equação de Knox (Equação 31) é usada em cromatografia líquida para determinar a contribuição da largura do último pico do soluto, onde A, B e C são constantes da equação de Knox, (relacionadas com fluxo, difusão longitudinal molecular e processo de transferência de massa, respectivamente), h é a altura do prato reduzido – calculado como $h = H/d_p$, onde H é a altura do prato teórico da coluna ($H = L/N$, onde L é o comprimento da coluna) – d_p é o diâmetro da partícula da fase estacionária e v é a velocidade da fase móvel reduzida ($v = u d_p / D_m$)

$$h = A v^{1/3} + \frac{B}{v} + C v \quad (31)$$

Na Equação 31, o termo A não pode ser expresso facilmente. O tratamento teórico ligado a esse termo está relacionado aos parâmetros estruturais da coluna empacotada como a porosidade, volume do poro, diâmetro do poro e irregularidade. O termo B por sua vez pode ser escrito na Equação 32, onde γ_m e γ_s são fatores de impedimento para difusão através do material granular e/ou poroso.

$$B = 2[\gamma_m + \gamma_s (D_s / D_m) k'] \quad (32)$$

O termo C (Equação 33) da equação de Knox (Equação 31) representa a contribuição da transferência de massa do soluto no alargamento da banda, onde ψ é a fração da fase móvel e q é o fator geométrico dependendo da porosidade.

$$C = q \left(\frac{k' + \psi}{1 + k'} \right)^2 \left(\frac{D_m}{\gamma_{sm} \psi D_m + k' \gamma_s D_s} \right) \quad (33)$$

A causa mais comum do alargamento da banda é a sobrecarga da fase estacionária. Isto pode ser atribuído ao fenômeno de exclusão dos solutos volumosos nos poros estreitos da fase estacionária. Além disso, interações entre a superfície dos silanóis (carregados negativamente) e as substâncias básicas (carregadas positivamente), especialmente aminas, aumentam a largura do pico correspondente, deformando-os.

Segundo Berthod e García-Alvarez-Coque (2000), se o soluto permanece um maior tempo dentro da micela e interage menos tempo com a fase estacionária, este será menos retido. Aparentemente, seria como se a coluna fosse menor para esse soluto do que ela realmente é. A constante que controla a difusão do soluto dentro da micela para fase aquosa é inversamente proporcional à constante de difusão da micela para fase aquosa (K_{MW}). Nos casos onde os solutos permanecem mais tempo dentro das micelas haverá uma redução de K_{MW} levando a uma diminuição no coeficiente de difusão na fase móvel (D_m). Isto mostra que o coeficiente de difusão D_m diminui em função da inclusão da micela. A difusão global do soluto (D_m) na fase móvel micelar, depende do coeficiente de difusão na micela (D_M) e do coeficiente de difusão do soluto na fase aquosa (D_w), conforme pode ser observado na Equação 34, onde ψ é dado pela constante de afinidade do soluto pela micela (K_{WM}), medido por MLC (Equação 35), onde o produto $[M]v$ é a porcentagem do volume da fase micelar e $(1 - [M]v)$ é a porcentagem do volume na fase aquosa.

$$D_m = \left(\frac{D_M}{1 + \psi} \right) + \left(\frac{D_w}{1 + 1/\psi} \right) \quad (34)$$

$$\psi = \frac{1 - [M]v}{K_{WM}[M]v} \quad (35)$$

Os solutos mais retidos e que mostram afinidade pela fase micelar são os que também possuem maior afinidade pelo surfactante adsorvido na superfície da fase estacionária e, portanto, terão menor eficiência, como é o caso dos solutos hidrofóbicos (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000).

Uma relação linear foi estabelecida entre K_{MW} e o tamanho da cadeia alquila do álcool primário usado como modificador orgânico. Com o aumento da cadeia alquílica, o álcool tem mais afinidade pela fase móvel micelar e menos afinidade pela fase aquosa. Dessa forma, a adição de alcoóis leva à diminuição da afinidade dos solutos pelas micelas, aumentando a taxa de saída do soluto da micela. Esse efeito pode ser medido pela variação da constante de K_{MW} (Berthod, 1997).

Na MLC, como as moléculas de alcoóis e surfactantes competem pelos sítios de adsorção na fase estacionária, a adição de álcool, dependendo do tamanho da sua cadeia, levará, em diferentes extensões, a uma diminuição da quantidade de surfactante adsorvido. Por sua vez, a dessorção do surfactante está ligada à redução da espessura da camada da fase estacionária (Φ ; Equação 30) e, conseqüentemente, provocará a diminuição da altura do prato teórico, H (Berthod, 1997).

Ao mesmo tempo em que há um ganho na eficiência (efeito cinético) quando se adiciona um modificador orgânico na fase micelar, há uma redução do tempo de retenção (efeito termodinâmico). A relação entre o fator de aumento da eficiência em função do valor de $\log K_{MW}$ foi estudado após adição de alcoóis em sistemas contendo benzeno e etilanttraquinona. Para o benzeno, o maior ganho na eficiência foi com a adição de butanol, enquanto para etilanttraquinona foi o hexanol, com um ganho de 22 vezes.

Outro fator a ser considerado é a viscosidade, já que quanto maior a viscosidade da fase móvel maior será a pressão no sistema cromatográfico e, portanto, será limitante para a escolha do modificador orgânico. A fase micelar híbrida é mais viscosa do que a fase micelar sem adição de modificador orgânico como os alcoóis. Especificamente para os alcoóis, o aumento da cadeia alquilílica também aumenta a viscosidade da fase móvel. A natureza e a quantidade de álcool que deve ser adicionado na fase móvel micelar deve ser escolhido em função da natureza e da concentração do surfactante (Berthod e García-Alavrez-Coque, 2000).

Segundo Berthod (1997), o aumento da temperatura provoca um efeito positivo no ganho da eficiência, porém diminui o tempo de retenção e a viscosidade da fase móvel. O decréscimo de k com a temperatura é previsto pela equação de Van't Hoff (Equação 28). Através de estudos com vários surfactantes em relação à variação de entropia e de entalpia, Berdad e Cotton (1991) chegaram à conclusão de que o processo de retenção em MLC é governado pelo efeito entrópico, sendo que a magnitude de diminuição de k em relação à adição de álcool é bem mais significativa se comparado com o efeito causado pela mudança na temperatura.

Concluindo, três fatores podem aumentar a eficiência em MLC: (i) aumento da temperatura; (ii) adição de modificador orgânico na fase móvel

micelar; (iii) baixos valores de razão de fluxo de trabalho. Todos esses fatores irão decrescer o tempo de retenção, porém se o tempo não for uma prioridade, a menor razão de fluxo poderá facilmente aumentar o ganho na eficiência e, conseqüentemente, na resolução cromatográfica.

2.4

Fluorescência

Na fluorimetria (ou na detecção fluorimétrica) o que é medido é a fluorescência, que envolve a transição radiante (com emissão de radiação eletromagnética no UV-visível) entre estados de mesma multiplicidade (no caso, ambos do tipo singlete). A espécie química fluorescente é comumente denominada fluoróforo (Ingle e Crouch, 1988). A fluorescência é comum nos compostos que possuem grupos aromáticos de estrutura rígida que favorecem transição eletrônica de baixa energia, do tipo $\pi\text{-}\pi^*$. A eficiência quântica fluorescente, que é a razão entre o número de fótons que excitam uma população de moléculas e o número de fótons emitidos por fluorescência por essa mesma população, tende a aumentar quando se tem maior conjugação de insaturações como, por exemplo, em sistemas aromáticos condensados. De forma geral, um aumento na extensão da conjugação desloca o espectro de absorção e de emissão para comprimentos de onda maiores (deslocamento batocrômico), além de aumentar o rendimento quântico de fluorescência.

A presença de substituintes doadores de elétrons (por exemplo, grupos carbonila) favorece a disponibilidade eletrônica dos sistemas insaturados conjugados tendendo a aumentar a capacidade da molécula em fluorescer. Por outro lado, a presença de heteroátomos na cadeia principal da estrutura de uma molécula pode vir a diminuir a fluorescência emitida, já que o heteroátomo pode promover a despopulação parcial do estado singlete excitado para o tripleto via acoplamento spin-orbital.

Para hidrocarbonetos aromáticos, as transições de menor energia são do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, que são caracterizadas por altos coeficientes de absorção molar e elevados rendimentos quânticos de fluorescência. Quando um heteroátomo está envolvido, a transição $n \rightarrow \pi^*$ em geral é a transição de menor energia. Essas transições caracterizam-se por possuir coeficientes de absorção molar que são aproximadamente 100 vezes menores do que aqueles das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e o tempo de vida radiante é 100 vezes mais longo. Isto explica o baixo rendimento quântico de fluorescência de muitas moléculas onde a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ é predominante. Isto acontece com a maioria dos compostos azo e com alguns

compostos que possuem grupamentos carbonila ou nitrogênio heterocíclico (nitrogênios tipo piridina).

O efeito de substituintes sobre as características de fluorescência dos hidrocarbonetos aromáticos é complexo e as generalizações devem ser feitas com cuidado. Ambas, natureza e posição de um substituinte podem afetar estas características. No caso dos substituintes que doam elétrons para o sistema, geralmente, ocorre uma indução do aumento do coeficiente de absorção molar e um deslocamento nos espectros de excitação e emissão para regiões de menor energia. Os espectros tendem a ficar mais largos e menos estruturados, porém a fluorescência é amplificada. Por outro lado, grupos cetônicos (-C=O) e carboxílicos (-COOH) fazem com que as substâncias tenham baixas energias associadas às transições $n \rightarrow \pi^*$ (transições preferenciais) e, por isso, exibem um baixo rendimento quântico de fluorescência. O decaimento de energia, favorecendo a mudança de multiplicidade da população excitada e, por consequência, diminuindo a fluorescência (Schulman, 1976). Em geral, a presença de átomos pesados como substituintes de moléculas aromáticas (ex. Br, I) resulta em uma extinção da fluorescência devido ao aumento na probabilidade do cruzamento intersistema.

Na Figura 14 é apresentado um diagrama parcial de níveis de energia que indica os processos envolvidos nas transições eletrônicas de uma população de moléculas fotoluminescente típica.

Neste diagrama, estão representados os níveis energéticos fundamental (S_0) e excitados S_1 e S_2 (singletos) e o T_1 (triplete). Após absorver fótons na região UV ou visível (A), a população de moléculas passa do estado fundamental para um estado excitado e, eventualmente, retornam ao estado S_0 pela combinação de vários mecanismos. A fluorescência (F) e a fosforescência (P) são os processos onde ocorre a emissão de fóton (indicados pelas setas cheias da Figura 14). Outras etapas são não-radiantes, como conversão interna e externa, ou etapas de relaxamento vibracional (RV) ou de cruzamento intersistemas (CIS) que estão indicados por setas sinuosas na Figura 14.

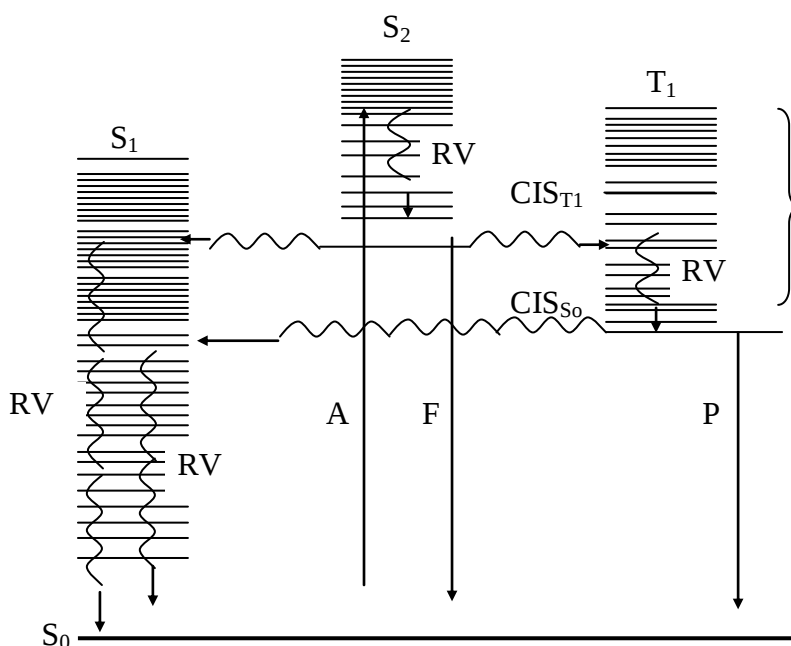


Figura 14. Diagrama de energia, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma população de moléculas absorver fótons na região do UV ou visível. Os singletos representados por S₀ (nível energético fundamental) podem absorver fótons na região UV ou visível (A) e passar para o níveis excitados S₁ e S₂ e o T₁ (triplete). A fluorescência (F) e a fosforescência (P) são os processos onde ocorre a emissão de fóton (indicados pelas setas cheias). RV (relaxamento vibracional) e CIS (cruzamento intersistemas) são etapas não-radiantes, como conversão interna e externa.

A desativação radiante denominada fluorescência não envolve uma mudança na multiplicidade do estado excitado (não há mudança no número quântico de spin do elétron promovido para o orbital de maior energia), isto é, a transição ocorre entre os estados singletos (mais comumente a transição S₁ → S₀). Como consequência, a fluorescência possui tempos de vida da ordem do ns. Assim, se a desativação por fluorescência for rápida em relação aos outros processos sem radiação, maior será a eficiência quântica (ϕ) do processo, já que esse parâmetro pode ser também expresso pela razão entre a constante de velocidade da fluorescência e o somatório das constantes de velocidade de todos os processos que desativam a população do estado excitado singlete. Essa relação é mostrada na Equação 36, onde k_f é a constante relativa à fluorescência, k_i é a constante relativa ao cruzamento intersistema, k_{ce} , k_{ci} , k_{pd} e k_d são, respectivamente, as constantes de conversão externa, conversão interna, pré-dissociação e dissociação. As constantes k_{pd} e k_d são dependentes da estrutura química, enquanto que as demais são fortemente influenciadas pelo ambiente e, em menor grau, pela estrutura (Ingle e Crouch, 1988).

$$\phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d} \quad (36)$$

A intensidade da fotoluminescência pode ser reduzida em função da presença de algumas substâncias conhecidas como supressoras ou *quenchers*. A supressão de luminescência ou *quenching* é qualquer processo, normalmente não-radiante, que faz com que a intensidade da luminescência de uma espécie química em uma amostra seja menor do que aquela esperada para um padrão da espécie de concentração equivalente (Ingle e Crouch, 1988).

Os processos de *quenching* podem ser dinâmicos ou estáticos. O *quenching* dinâmico ou colisional requer contato entre o luminóforo excitado e a espécie supressora. Já no *quenching* estático, a molécula supressora e o fluoróforo, no estado fundamental, formam um complexo estável não fotoluminescente. A natureza do sistema de solventes também é fator relevante sendo que a sua viscosidade, polaridade e caráter prótico podem afetar, significativamente, a luminescência. A viscosidade pode diminuir a taxa de colisões bimoleculares com as espécies supressoras de luminescência diminuindo o efeito de supressão seja do tipo estático ou dinâmico. Já a polaridade e o caráter prótico do solvente são importantes, pois afetam as energias relativas do estado excitado que afetam a eficiência dos processos não radiantes de desativação de população no estado excitado. Estrutura molecular e rigidez estrutural, composição do sistema de solventes, temperatura e pH do meio também podem afetar a intensidade da fluorescência, logo, a escolhas das condições experimentais, por exemplo, da fase móvel em cromatografia, tem repercussão na qualidade da medição de fluorescência.

Em especial, o efeito do pH dos sistemas de solventes próticos é relevante na fluorescência em moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos, sendo muito comum observar uma diferença significativa entre as propriedades luminescentes de moléculas protonadas e não-protonadas. De fato, um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior eficiência quântica devido à protonação ou hidrólise.

A excitação de uma molécula aromática que possui um grupo funcional ácido ou básico altera a distribuição das cargas eletrônicas na molécula como um

todo, resultando em um aumento ou decréscimo da densidade eletrônica na região ácida ou básica do grupo funcional diretamente ligado ao anel aromático (Schulman, 1976). A ocorrência de reações ácido-base entre moléculas orgânicas excitadas e componentes do sistema de solventes é um fenômeno que pode ocorrer, especialmente em meio aquoso. Em alguns casos, somente a forma protonada ou desprotonada do analito pode ter fluorescência relevante. Assim, a variação do pK_a do estado excitado pode influenciar a intensidade da fluorescência, como ilustrado no esquema da Figura 15 (Schulman, 1976). De fato, o valor do pK_a de uma espécie química no estado excitado pode ser de 4 a 9 vezes menor que o valor pK_a no estado fundamental (Ingle e Crouch, 1988).

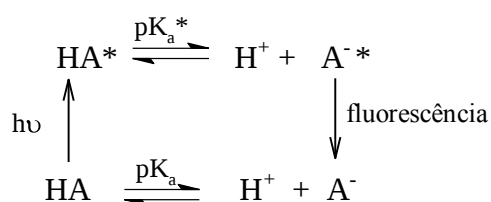


Figura 15. Esquema da protonação, desprotonação, excitação e fluorescência de moléculas orgânicas que possuem caráter ácido-base.

As substâncias aromáticas, tais como a maioria dos luminóforos, são mais polares quando estão no estado excitado, devido às mudanças na distribuição de elétrons π da molécula que acontecem na transição. As interações entre as moléculas do(s) solvente(s) com as moléculas do soluto têm caráter fortemente eletrostático e, como normalmente são as diferenças entre as energias de estabilização do estado fundamental e do estado excitado que definem que processos (radiante ou não-radiante) são dominantes na desativação do estado excitado.

Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) têm o processo de desativação não-radiante por CI significativamente minimizado com consequente aumento da eficiência quântica. Estruturas moleculares planares também favorecem a fluorescência, pois aumenta a interação e a conjugação entre o sistema de elétrons π . A organização obtida num meio rico em micelas podem produzir efeitos significativos nos parâmetros de luminescência como comprimentos de onda de excitação e emissão, rendimento quântico, tempo de vida fluorescente. Isso decorre de mudanças no ambiente de solvatação ao redor

do luminóforo (que afeta a energia relativa dos estados excitados) do aumento de viscosidade do meio e a proteção que o sistema organizado pode promover em termos de minimização de efeitos de supressão além da restrição de vibrações que levam ao relaxamento da molécula por processos não radiantes. (Pelizzetti e Pramauro, 1985).

O ganho de sensibilidade depende da natureza do analito e do tipo de sistema micelar empregado. Isto se deve ao fato de o grau de associação entre a micela e o analito depender do microambiente formado pela particularidade da micela adicionada. Em todos os casos, o enriquecimento da fluorescência (aumento da fluorescência medida) tem como consequência geral a melhora do limite de detecção dos analitos, porém tendo que se avaliar também o efeito da presença de micelas, em solução, no ruído (Hinze et al., 1984).

Segundo Aiken e colaboradores (1991), o grau de enriquecimento de fluorescência depende da natureza da interação soluto-micela. Em seus estudos com bilirrubina em plasma, fluorescência mais intensa foi observada para o complexo bilirrubina-CTAB devido ao número de interações sendo provavelmente o fator mais significativo o decréscimo do relaxamento vibracional causado pelo hidrogênio da bilirrubina ligado ao meio aquoso através da solubilização do analito dentro do núcleo hidrofóbico da micela.

Outros exemplos de enriquecimento de fluorescência foram: os alcançados pelos estudos de Biswas et al. (1999) com moléculas de corantes, como a fluoresceína, em meios organizadores utilizando SDS; por Takeuchi (1997) que determinou aminoácidos com ganho de até 12 vezes, em termos de limite de detecção, em meio rico em micelas de brometo de hexadeciltrimetilamônio, quando comparado ao sistema aquosos simples e por Culzoni et al. (2010) que obteve aumento de fluorescência de seis vezes para a galantamina quando o sistema aquoso foi enriquecido com micelas de SDS.

Existem muitos estudos na literatura que comprovam a melhora significativa do limite de detecção de substâncias detectadas por fluorescência em abordagens por MLC em relação ao uso da cromatografia convencional (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000), porém afirmar que a presença de micelas é a causa única para o enriquecimento de sinal pode ser um equívoco, já que outras condições, como a proporção relativa de solventes orgânicos e pH também devem ser levados em consideração.

2.5

Validação

2.5.1

Parâmetros de mérito

A Validação é definida, pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), como uma verificação na qual requisitos especificados são adequados para um uso pretendido. A avaliação dos parâmetros de validação possibilita a determinação das características de desempenho de um método analítico (INMETRO, 2010). Alguns dos parâmetros analíticos de validação que são exigidos pelo INMETRO são: Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ); Linearidade (faixa de trabalho e faixa linear dinâmica); Sensibilidade; Precisão (repetibilidade e precisão intermediária); Exatidão (recuperação e comparação entre métodos).

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) é definido como a concentração do analito que produz um sinal que pode ser diferenciado, estatisticamente, do sinal do branco. Já o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração ou teor do analito que pode ser quantificado com a menor incerteza aceitável e é considerado o limite inferior da faixa linear de resposta analítica (Valcárcel, 1999; INMETRO, 2010; MAPA, 2011). Na cromatografia, o LOD e o LOQ podem ser calculados a partir de introduções de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes de analito, até que se atinja o menor pico possível de integração pelo *software* do cromatógrafo. Após achar a concentração correspondente ao limite inferior da resposta analítica, uma curva analítica é construída. Uma solução com a concentração correspondente ao limite inferior da resposta analítica foi introduzida dez vezes no sistema cromatográfico e a média dos resultados, em concentração, $\bar{X}$, e seu desvio padrão, s , foram usados para o cálculo do LOD (Equação 37) e do LOQ (Equação 38).

$$\text{LOD} = X + 3s \quad (37)$$

$$\text{LOQ} = X + 10s \quad (38)$$

Linearidade da resposta analítica

A resposta linear é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado, produzindo curvas analíticas que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (INMETRO, 2010; MAPA, 2011). A equação da reta que representa uma curva analítica linear é indicada simplificada na Equação 39, onde, y é resposta medida (sinal analítico, área do pico, etc.); x é concentração; m é a sensibilidade da curva analítica; b é a interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

$$y = mx + b \quad (39)$$

A linearidade da resposta analítica pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação linear (R) que é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a equação da reta como modelo matemático. O coeficiente de determinação, R^2 , fornece a ideia percentual de correlação dos pontos com a reta. Quanto mais próximo de 1, melhor é a representação do modelo matemático expresso pela equação da reta, entretanto, a avaliação da linearidade apenas pelo R^2 pode induzir a erros.

No método dos mínimos quadrados simples se supõe que as medições têm a mesma variância, o que na curva analítica, isto significa que a precisão das medidas é independente do valor da concentração e, portanto, pode ser caracterizado por um único desvio padrão. Esta condição de variância uniforme é chamada de homocedasticidade. Nos casos onde as variâncias aumentam com o aumento da concentração, ao longo da curva analítica, é chamado de heterocedásticos, e nesses casos, deve-se usar um modelo de regressão linear ponderada.

A avaliação dos desvios da linearidade deve ser feita utilizando a estatística dos resíduos, que descreve o erro no ajuste do modelo, desde que o

coeficiente de correlação esteja dentro de critérios aceitáveis. O cálculo dos desvios da linearidade pode ser realizado pela determinação dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão linear. Se os resíduos variam de forma aleatória ao longo do eixo principal, significa que as variâncias não são tendenciosas e o modelo é linear. As variâncias pode ser semelhantes (homocedástico) e o comportamento pode não ser linear. (Analytical Methods Committee, 1994).

A faixa linear é aquela na qual a resposta do método apresenta é linear e gera resultados proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2010).

Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico é definida como a sua capacidade de diferenciar concentrações muito próximas ou sua capacidade de poder detectar qualitativamente e/ou quantitativamente pequenas concentrações do analito de interesse em amostras. De uma forma geral, a sensibilidade (S) é a relação entre o sinal analítico e a concentração, ou a relação entre a variação do sinal com a variação da concentração do analito (Valcárcel, 1999; INMETRO, 2010; MAPA, 2011).

Precisão

Precisão é o grau de concordância entre um grupo de resultados obtidos ao aplicar repetidas e, independentemente, o mesmo método analítico às alíquotas da mesma amostra, ou seja, é a dispersão dos resultados entre um resultado e a média dos resultados. As três maneiras de expressar a precisão de um método são os ensaios de repetibilidade, de precisão intermediária e de reprodutibilidade, sendo que esta última só pode ser determinada em um ensaio de interlaboratorial colaborativo (MAPA, 2011).

A repetibilidade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A repetibilidade pode ser expressa em termos da característica de dispersão dos resultados e pode ser determinada em diferentes

níveis de concentração da faixa linear (INMETRO, 2010). A precisão intermediária é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras (INMETRO, 2010).

A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas através do uso de Análise de Variância com um fator (ANOVA). A ANOVA é uma técnica pela qual é possível isolar e estimar as variâncias dentro de um grupo (repetibilidade) e entre grupos (precisão intermediária) que contribuem para a variação total do experimento. Ela permite identificar quais as variâncias relevantes e estabelece meios para estimar seus efeitos. A Equação 40 foi usada para o cálculo da repetibilidade, onde MQ_{dentro} é a soma dos mínimos quadrados de cada dia e “n” o número de réplicas. A Equação 41 foi usada para calcular precisão intermediária, onde MQ_{entre} é a soma do quadrado dos resíduos entre os grupos dividido pelo grau de liberdade e n é o número total de ensaios.

$$s_{dentro}^2 = MQ_{dentro} \quad (40)$$

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n \quad (41)$$

Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (Ribani et al., 2004; VIM, 2012). Os processos mais comuns para avaliar a exatidão do método são: comparação entre métodos, material de referência certificado e ensaio de recuperação (INMETRO, 2010).

A comparação entre métodos possibilita verificar o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelo método em desenvolvimento e pelo método escolhido para comparação, sendo realizada por meio de análises da mesma amostra em separado, ou seja, pela avaliação da exatidão do método proposto com o escolhido para comparação (INMETRO, 2010; Ribani et al., 2004).

O percentual de recuperação do analito pode ser definido como a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito (C_1), e o valor teórico desta quantidade fortificada (C_2), segundo a Equação 42.

$$\text{recuperação} = (C_1/C_2) \times 100\% \quad (42)$$

Segundo o documento orientativo do INMETRO – DOC-CGCRE008 – para a avaliação da recuperação pode-se utilizar amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em três níveis de concentração: baixo, médio e alto, de acordo com a faixa linear do método (INMETRO, 2010). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise geralmente estão entre 80 e 120%. Porém, dependendo da complexidade analítica, da natureza da amostra e da concentração desta na matriz, este valor chega a 50 a 120% (MAPA, 2011; Ribani et al., 2004).

2.6

Estudos de Incerteza

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), o termo incerteza de medição é definido como o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. O resultado de uma medição não pode ser caracterizado por um único valor, pois todo o processo possui fontes de incerteza que devem ser identificadas, quantificadas e, se possível, minimizadas, a fim de garantir que a informação obtida de uma medição seja real, a estimativa da incerteza é crucial para permitir resultados verdadeiros. Sendo assim, a incerteza deve ser associada à medida para dar maior confiabilidade na validade do resultado.

O cálculo da incerteza pode ser feito a partir dos dados obtidos na validação do método analítico, já que estes englobam várias fontes de incerteza. As fontes de incerteza de um resultado podem provir de muitas fontes possíveis, entre as quais: definição incompleta de um mensurando, amostragem, amostragem não representativa, homogeneidade da amostra, efeitos de matriz e interferências, estabilidade da solução, incertezas da massa e vidrarias volumétricas, aproximações, variações aleatórias, entre outras (Eurachem, 2002; INMETRO, 2008).

Utilizando um modelo incompleto, que avalia grupos de fontes de incerteza de mesma característica, os principais grupos de fontes de incerteza de medição da real concentração do analito para os métodos propostos por MLC foram: (i) preparo das soluções (u_{sol}), (ii) repetibilidade (u_r), (iii) precisão intermediária (u_{pi}) e (iv) curva analítica (u_{curva}).

Na Figura 16 é apresentado o diagrama de causa e efeito usado para a organização e agrupamento dos componentes de incerteza do resultado da concentração real dos analitos. O diagrama representa a resposta analítica do mensurando no vetor principal, bem como a contribuição das principais fontes de incerteza nas ramificações, separadas nos quatro grandes grupos já citados.

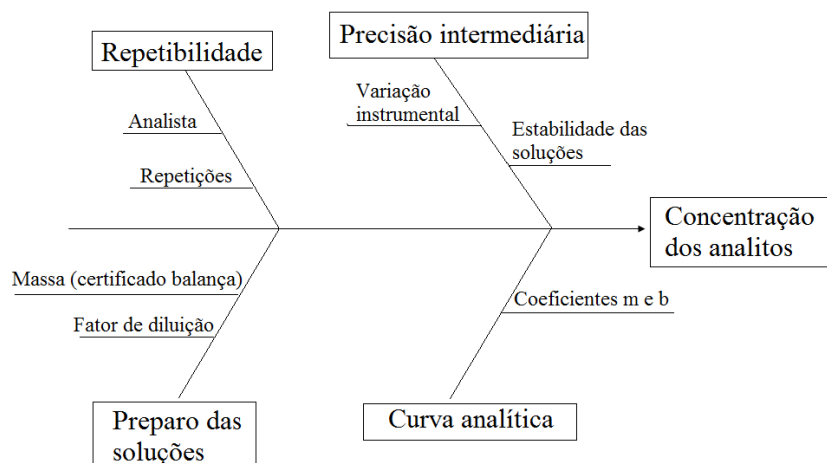


Figura 16. Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração real dos analitos.

2.6.1

Fontes de incerteza

O procedimento para a estimativa da incerteza padrão combinada, $u_c(y)$, descrita no Guia para a Expressão da Incerteza na Medição (GUM 2008) é baseado em uma relação entre os resultados das medições (y) e as incertezas dos parâmetros independentes ($x_1, x_2 \dots x_n$), sob a forma $y = f(x)$, conforme indicado na Equação 43, onde $\partial y / \partial x_i$ são coeficientes de sensibilidade (c_i) em relação a cada fonte de incerteza e os valores $u^2(x_i)$ são as variâncias associadas a cada uma das fontes.

$$u^2(y(x_i)) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \frac{\partial y}{\partial x_j} \right) \text{cov}(x_i, x_j) \quad (43)$$

Considerando que todos os parâmetros que contribuem para a medição são independentes (covariância nula para os diferentes valores de entrada), a incerteza combinada, $u(y)$, é, então, avaliada de acordo com princípios de propagação de erro (Equação 44).

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (44)$$

2.6.2

Incerteza em relação aos parâmetros da curva analítica

A partir da relação linear entre concentrações e as áreas dos picos cromatográficos foram calculados o coeficiente angular (m) e o linear (b) e suas respectivas incertezas, u_m e u_b . A partir desses dados, foi possível calcular a incerteza associada à curva analítica como indicado na Equação 45, onde, c_{im} e c_{ib} são os coeficientes de sensibilidade, s_b e s_m são, respectivamente, os desvios padrões para os coeficientes linear e angular e r é o coeficiente de correlação.

$$u_{curva} = \sqrt{((c_{ib}^2 \times s_b^2) + (c_{im}^2 \times s_m^2) + (2c_{ib} \times c_{im} \times u_m \times u_b \times r))} \quad (45)$$

Considerando que a área do pico (y) dentro de uma resposta analítica linear obedece a Equação 39, os valores de s_b e s_m podem ser obtidos das Equação 46 e Equação 47, onde os valores de x indicam cada uma das n concentrações usadas para construir a curva analítica contendo n pontos. Os símbolos s^2 e D são respectivamente a variância e o desvio da curva, que são dados pela Equação 48 e Equação 49, onde Δ é a diferença entre o valor teórico de x ($x_{teórico}$) no melhor ajuste da curva e o valor experimental de x ($x_{experimental}$).

$$s_b^2 = \frac{s^2 \times \sum x^2}{D} \quad (46)$$

$$s_m^2 = n \frac{s^2}{D} \quad (47)$$

$$D = (n \times \sum x^2) - (\sum x)^2 \quad (48)$$

$$s^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n - 2} \quad (49)$$

As incertezas u_b e u_m foram calculadas utilizando as Equação 50 e Equação 51.

$$u_b = \sqrt{s_b^2} \quad (50)$$

$$u_m = \sqrt{s_m^2} \quad (51)$$

Os coeficientes de sensibilidade c_{ib} e c_{im} (Equação 52 e Equação 53) são usados para uniformizar as unidades dimensionais das incertezas, permitindo assim o cálculo da soma quadrática.

$$c_b = \frac{\partial y}{\partial b} = -\frac{1}{m} \quad (52)$$

$$c_m = \frac{\partial y}{\partial m} = \frac{y-b}{m^2} \quad (53)$$

Sendo que o termo r é dado pela Equação 54.

$$r = -\frac{\sum x}{\sqrt{(n \times \sum x^2)}} \quad (54)$$

2.6.3

Incerteza em relação à Repetibilidade e Precisão Intermediária

A estimativa da incerteza para a repetibilidade, u_r , foi calculada pela razão entre a soma dos quadrados dos desvios das medidas de um mesmo grupo s_r (s_{dentro}) (Equação 40) e o número de medidas, n . E a estimativa da incerteza para a precisão intermediária, u_{pi} , foi calculada pela raiz dos desvios entre os dias s_{pi} (s_{entre}) (Equações 41). Desta forma, as estimativas das incertezas para esses dois parâmetros, então foram calculadas pela Equação 55 e pela Equação 56 a seguir.

$$u_r = s_r / \sqrt{n} \quad (55)$$

$$u_{pi} = \sqrt{s_{pi}} \quad (56)$$

2.6.4

Incerteza em relação ao preparo da solução

A incerteza associada ao preparo da solução, u_{sol} , foi calculada (Equação 57) considerando as etapas críticas do preparo de soluções, que são as incertezas associadas às diluições e a incerteza associada à balança analítica.

$$u_{sol} = \sqrt{(u_{bal(ngg^{-1})})^2 \times u_{dil}} \quad (57)$$

onde $u_{bal(ngg^{-1})}$ foi a incerteza da balança analítica, em $ng\ g^{-1}$, e u_{dil} foi a incerteza associada ao fator de diluição (f_{dil}). A incerteza associada à balança analítica, $u_{bal(g)}$, foi obtida a partir da incerteza expandida da balança analítica ($U_{bal,k=2,95\%}$), proveniente do certificado de calibração da balança utilizada, onde $u_{bal} = U_{bal}/k$. O valor de $u_{bal(g)}$ deve ser convertido para concentração, em $ng\ g^{-1}$, para que essa fonte de incerteza possa ser utilizada na soma quadrática final para o cálculo de u_{sol} . Tal transformação foi feita multiplicando o valor de $u_{bal(g)}$, em massa, pelo coeficiente de sensibilidade de acordo com a Equação 58 onde $c_{analita(ngg^{-1})}$ foi a concentração da solução estoque, em $ng\ g^{-1}$.

$$u_{bal(ngg^{-1})} = u_{bal(g)} \times c_{analita(ngg^{-1})} / 1_{(g)} \quad (58)$$

A incerteza u_{dil} foi calculada pela Equação 59, onde $m_{soluções}$ (ng) foi a massa da solução e $m_{alíquotas}$ foi a massa (ng) da alíquota utilizada na diluição. Os parâmetros calculados na Equação 57, Equação 58 e Equação 59 dependem tanto do analito quanto do nível de concentração.

$$u_{dil} = \sqrt{(f_{dil} \times u_{bal(ngg^{-1})})^2 + ((\sum m_{soluções(ng)} / (m_{alíquotas(ng)})^2 \times u_{bal(ngg^{-1})})) \quad (59)$$

2.6.5

Incerteza Combinada (u_c) e Incerteza Expandida (U)

Como as fontes de incerteza já foram identificadas e quantificadas, pode-se proceder com o cálculo da incerteza combinada (u_c), pela soma quadrática destas fontes (Equação 60):

$$u_c = \sqrt{u_r^2 + u_{ip}^2 + u_{curve}^2 + u_{sol}^2} \quad (60)$$

A determinação da incerteza expandida foi realizada a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada $u_c(y)$ por um fator de abrangência k , conforme a Equação 61:

$$U = u_c(y)k_{v,p} \quad (61)$$

Para a maioria das aplicações analíticas deve ser usada a incerteza expandida, U . A incerteza expandida fornece um intervalo dentro do qual acredita-se, com um alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. O valor de U é obtido pela multiplicação de $u_c(y)$ por um fator de abrangência, k . A escolha do fator k é baseada no nível de confiança desejado que, em muitos casos, é um valor de Student tabelado (a um determinado nível de probabilidade). Para um nível de confiança de 95,4%, k é 2 (Eurachem, 2002; INMETRO, 2008). Então, o resultado de uma medição pode ser expresso conforme Equação 62:

$$Y = y \pm U \quad (62)$$

O intervalo $y - U$ a $y + U$ é o com o qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a Y (Eurachem, 2002). Este intervalo pode ser expresso como $y - U \leq Y \leq y + U$.