

3.

Materiais e métodos

3.1

Instrumentação

3.1.1

Espectrofotômetros

As medições de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro de absorção molecular no UV-visível modelo 8453 (Agilent, EUA), com feixe simples, fontes de radiação de deutério (UV) e tungstênio (vis) e detector de arranjo de fotodiodos. Os espectros foram processados com auxílio do *software ChemStation*. Espectros de fluorescência foram feitos em um espectrofotômetro de luminescência modelo LS 55 da Perkin Elmer (EUA) cuja fonte de excitação é uma lâmpada pulsada do tipo descarga de xenônio (20 kW com 8 μ s de duração de pulso) e o detector é um tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928, sensível para radiação até 900 nm. Os espectros de fluorescência foram processados com auxílio do programa *FLwinlab*®.

3.1.2

Instrumentos usados nas abordagens cromatográficas

Os métodos propostos de MLC e algumas das análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com fase reversa foram realizadas em um cromatógrafo líquido modelo 1200 *series Infinity* (Agilent) equipados dos seguintes módulos: degaseificador, bomba binária SL, amostrador automático com capacidade máxima de volume de injeção de 100 μ L e compartimento para até 100 vials, forno para coluna modelo G1316 A/B/C, detector fotométrico de luminescência multicanal modelo 1321A e detectores absorciométricos (um do

tipo arranjo de diodos e outro multicanal SL modelos G1315C e G1365D/D). Os cromatogramas foram processados com auxílio do *software ChemStation*.

A comparação de métodos para os alcaloides β -carbolinas foi feito por cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) em um sistema de eletroforese capilar (Agilent) equipado com detector absorciométrico no UV-vis do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; um sistema de injeção hidrodinâmica de amostra e programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent.

Para realizar os estudos do enriquecimento de sinal de fluorescência com adição de solução micelar após separação cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo líquido Modelo UltiMate 3000 series (Dionex, USA) equipado com os seguintes módulos: degaseificador, bomba quaternária principal, bomba isocrática secundária, amostrador automático, forno para coluna, detector fotométrico de fluorescência e detector absorciométrico do tipo arranjo de diodos multicanal. A bomba quaternária foi utilizada para bombear a fase móvel para a coluna cromatográfica e a bomba isocrática, para bombear a solução inserida, em linha, após a coluna cromatográfica e antes do detector fluorimétrico. O eluente proveniente da coluna e a solução inserida após a separação na coluna foram misturados com o auxílio de uma mola de reação sobressalente de volume igual a 125 μL , adquiridos pela Dionex (USA). Os cromatogramas foram processados com auxílio do *software Chromeleon*. A montagem do sistema de pós-coluna está ilustrada na Figura 17.

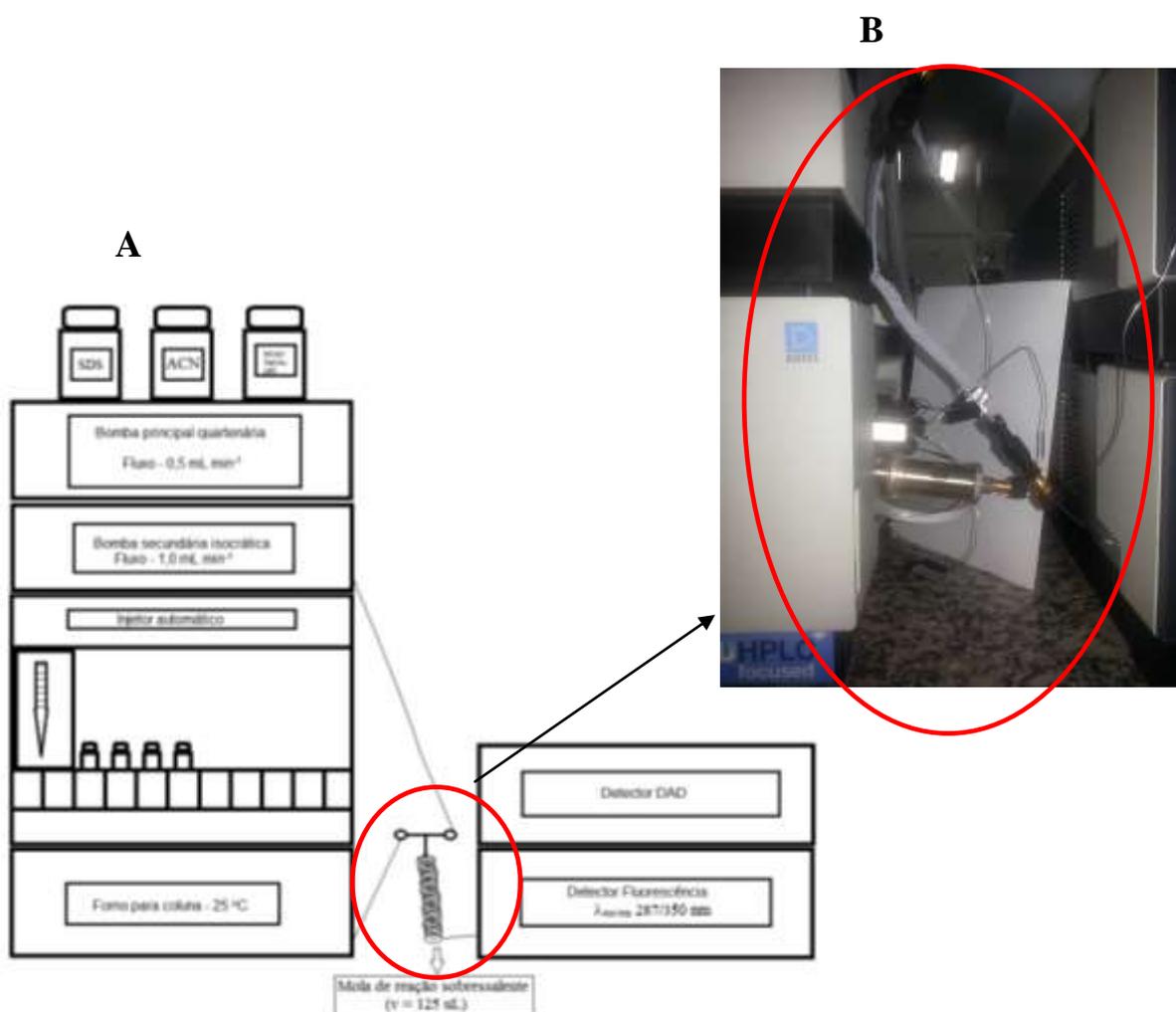


Figura 17. Esquema do sistema de adição pós-coluna da solução micelar (A) e foto do equipamento com destaque para a mola de reação sobressalente (B).

3.1.3

Equipamentos auxiliares

As massas dos padrões e amostras foram medidas em uma balança analítica modelo A UW 220D (Shimadzu, Japão) de quatro casas decimais, calibrada em um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (SJS Serviços LDTA – Rio de Janeiro, Brasil).

As medições de pH das soluções e das fases móveis micelares foram realizadas em um pHmetro da marca Tecnonon modelo MPA 210, versão 2.3, calibrado diariamente em três pontos de pH com as soluções tampões padrão Certipur Merck pH 4,00 ± 0,01; 7,00 ± 0,01 e 9,00 ± 0,01. O eletrodo utilizado foi o tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de

Ag/AgCl. Uma centrífuga modelo BE 4000 Brushless Bio-Eng (Brasil) foi utilizada no processo de limpeza (*clean up*) das amostras de urina. Para a melhor dissolução de alguns solutos e do SDS e para a degaseificação das fases móveis e solventes usados em cromatografia líquida foi necessário o uso de um banho ultrassônico de 9 L, modelo NSC2800 (Unique, Brasil).

3.2

Padrões e reagentes

A água utilizada em todas as soluções foi obtida de um sistema de ultrapurificação de água Millipore (EUA) modelo Milli-Q Plus A-10 Gradiente, com resistividade de cerca de 18,2 M Ω cm.

Os padrões dos alcaloides (com indicação do acrônimo e da pureza entre parênteses) foram harmalol (HLOL, 98%), harmane (HAE, 98%), norharmane (NOR, 98%), harmine (HIE, 98%) e harmaline (HLINE, 90%) foram adquiridos da Acros Organics (EUA) e harmol (HOL 98%) foi adquirido da MP Biomedicals, LLC (Alemanha).

Os padrões galantamina (GAL) e seus metabólitos epigalantamina (EP), *N*-desmetil galantamina (ND), *O*-desmetil galantamina (OD) e *N*-óxido galantamina (NOx) foram comprados da Toronto Research Chemicals Inc. (Canadá). Para esses padrões não foram indicadas as purezas, logo foram assumidos valores de 100%.

O surfactante utilizado para preparar a fase móvel micelar foi o dodecilsulfato de sódio (SDS) adquirido da Merck (Alemanha) de pureza 99%. Os solventes orgânicos, metanol (MeOH), propan-2-ol e acetonitrila (ACN) são da marca J.T. Baker (EUA), grau HPLC/Espectro. A trietilamina ((Et)₃N) 99,5% de pureza foi da Sigma-Aldrich (EUA).

Hidróxido de sódio (99%), acetato de sódio triidratado (99,5%), hidrogenofosfato dissódico (99%) foram da Merck. O sulfato de amônio e o cloreto de sódio foram adquiridos da Vetec (Brasil). O ácido bórico e o ácido fosfórico (dosagem de 85% p/v e densidade 1,7 g cm⁻³) foram da Merck (Alemanha), o ácido clorídrico (dosagem de 36,5 – 38% p/v e densidade 1,2 g

cm^{-3}) foi da marca Isofar (Brasil), o ácido acético glacial (dosagem de 99,7% p/v e densidade $1,1 \text{ g cm}^{-3}$) foi da Tedia (EUA).

3.3

Materiais

As micropipetas de volume variável (0,5 a 1000 μL) e os balões volumétricos de 10,00 e 5,00 mL foram calibrados em um laboratório integrante da RBC (Laboratório de Caracterização de Fluídos da PUC-Rio).

As varreduras espectrais de absorvância foram feitas nas soluções colocadas em cubetas com duas faces de quartzo e 1 cm de caminho ótico. Para as medidas de fluorescência das soluções foram utilizadas cubetas de quatro faces de quartzo e caminho ótico de 1 cm.

Membrana de fibra de vidro de 0,22 μm de porosidade e 30 mm de diâmetro, adquiridos da Whatman (EUA), foram usadas para filtração de água, soluções aquosas e solventes orgânicos. Membranas filtrantes de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 μm de porosidade e 30 mm de diâmetro, da marca Whatman, foram usadas para filtrar as soluções padrões dos analitos e as amostras. Os frascos de amostra para injeção “vials” de 2 mL) utilizados para a introdução das soluções nos amostradores automáticos dos cromatógrafos foram adquiridos da Agilent.

As colunas cromatográficas utilizadas nas análises por cromatografia líquida de fase reversa e para o método por MLC para os alcaloides da classe das β -carbolinas foram de fase estacionária Zorbax Eclipse C18 (4,6 x 150 mm, diâmetro médio das partículas de 5 μm e porosidade de 120 angstroms). Para a separação da GAL e seus metabólitos foi utilizada uma pré-coluna Zorbax 300 Extend C18 (4,6 x 12,5 mm, diâmetro médio das partículas de 5 μm e porosidade de 300 angstroms) e uma coluna cromatográfica Zorbax 300 Extend C18 (4,6 x 150 mm, diâmetro médio das partículas de 5 μm e porosidade de 300 angstroms). Todas as colunas foram adquiridas da Agilent.

Os capilares de sílica fundida para as análises por eletroforese capilar, adquiridos da Simplus Capillaries (EUA), foram preparados com o corte no

tamanho desejado e remoção do revestimento de poliamida para abrir a janela de detecção e as extremidades do capilar que ficam em contato com as soluções do eletrólito de corrida que fecham o circuito do sistema. Copos de polipropileno de 1 mL, alinhadores e cassetes (compartimento que acopla o capilar ao equipamento) foram adquiridos da Agilent.

3.4

Soluções

3.4.1

Soluções estoque

As soluções padrões de β -carbolinas e da GAL e seus metabólitos foram preparadas com massas dos padrões medidas em balança analítica, dissolvidos em metanol e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico. Todas as soluções padrões foram guardadas em frascos de vidro, refrigerados a 4°C e ao abrigo da luz. A transferência quantitativa de pequenos volumes de alíquotas foi realizada com auxílio de micropipetas de volume variável.

3.4.2

Soluções utilizadas na determinação de pK_a por espectrofotometria no UV-visível

As soluções utilizadas na determinação do pK_a das β -carbolinas (HAE, NOR e HIE) em solução aquosa na ausência e na presença de micelas do surfactante SDS foram preparadas a partir da diluição da solução estoque do padrão desses analitos. Para cada determinação foram preparadas oito soluções, cada uma num diferente valor de pH (soluções tamponadas no pH desejado). Porém, para a obtenção dos espectros das β -carbolinas totalmente protonadas, as soluções foram mantidas com pH abaixo de 1 (com adição de HCl na

concentração final de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Da mesma forma, para se obter o espectro somente das espécies neutras foi adicionada uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até que o pH fosse elevado para valores acima de 12. As seis soluções restantes foram preparadas em tampão hidrogenofosfato dissódico (10 mmol L^{-1}) e o pH, para cada conjunto de soluções de analito, acertado com ácido fosfórico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para valores próximos ao valor do pK_a de cada um dos analitos. Para manter a força iônica constante e igual em todas as oito soluções foi adicionado uma solução de NaCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com concentração final igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nas soluções organizadas por micelas, o surfactante SDS foi adicionado na solução diluída dos alcaloides obtendo concentração final de 100 mmol L^{-1} (valor acima da CMC do SDS).

3.4.3

Soluções usadas para obter os comprimentos de onda para a medição de fluorescência e do fator de enriquecimento micelar

As soluções utilizadas para a obtenção dos comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) das β -carbolinas (todas na concentração de $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e da GAL e dos metabólitos (todos na concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas a partir da diluição das soluções-estoque em fase móvel micelar. As fases móveis micelares utilizadas nessas diluições possuíam a composição e valor de pH idênticos a fase otimizada correspondente para cada analito em estudo.

O cálculo do fator de enriquecimento micelar (MEF), realizada apenas para a GAL, foi feito com base na razão da intensidade da fluorescência do analito em meio aquoso na ausência e na presença SDS (em concentração acima da CMC). Para tal, a solução estoque de GAL, com concentração igual a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foi diluída em tampão acetato (10 mmol L^{-1} ; pH 3,0) contendo ou não surfactante SDS (concentração final de 100 mmol L^{-1}). Para a correção do sinal do branco, a absorvância das soluções de tampão acetato (10 mmol L^{-1} ; pH 3,0) na presença ou ausência de SDS foram medidas para compensar a absorção de radiação UV por estes meios e obter o ganho de intensidade do sinal líquido da GAL na presença de SDS.

3.4.4

Soluções usadas em cromatografia líquida micelar (MLC)

Todas as soluções de analitos usadas nos estudos por cromatografia líquida foram preparadas a partir das soluções estoque e diluídas em fase móvel micelar, sempre com a composição idêntica à da fase que estava sendo usada na referida análise.

A fase móvel micelar utilizada na separação das β -carbolinas foi preparada dissolvendo uma massa específica de SDS, correspondente ao necessário para atingir a concentração desejada, em solução aquosa contendo hidrogenofosfato dissódico (10 mmol L^{-1}) e 0,5%, em volume, de $(\text{Et})_3\text{N}$. O valor de tamponamento em pH 8,0 da fase móvel micelar foi ajustado com adição de volume de solução de ácido fosfórico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) suficiente para atingir o pH desejado.

A fase móvel micelar utilizada na separação da GAL e de seus metabólitos difere do que foi descrito apenas na concentração final de SDS e no tampão usado para atingir o pH 5,0 dessa fase móvel. Uma massa específica de SDS, correspondente ao necessário para atingir a concentração desejada, foi dissolvida em solução aquosa contendo acetato de sódio (10 mmol L^{-1}) e 0,5% em volume, $(\text{Et})_3\text{N}$. O valor de tamponamento em pH 5,0 da fase móvel micelar foi ajustado com adição de volume de solução de ácido acético ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) até se atingir o pH desejado.

3.4.5

Soluções usadas na cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC)

O método cromatográfico (usando a abordagem MEKC) usado para comparação de resultados obtidos com o método desenvolvido para as β -carbolinas foi reproduzido exatamente como indicado no trabalho de Marques et al. (2008). O eletrólito de trabalho foi preparado pela mistura e diluição de volumes específicos de soluções estoque aquosas de SDS e de ácido bórico. O eletrólito resultante continha 50 mmol L^{-1} de SDS, 20 mmol L^{-1} de ácido bórico, 15%, em volume, de acetonitrila (usado como modificador orgânico). O

tamponamento com ajuste de pH 9,0 foi feito com adição de solução de NaOH (1 mol L⁻¹). Nesse método, as soluções padrões dos alcaloides β-carbolinas, utilizadas foram preparadas por meio da diluição das soluções estoque, em solução contendo 75%, em volume, de tampão borato (20 mmol L⁻¹; pH 9,0) e 25% de água ultrapura.

3.4.6

Soluções usadas na cromatografia líquida de fase reversa

O método cromatográfico com fase reversa usado para comparação de resultados obtidos com o método desenvolvido para a GAL foi adaptado, com modificações mínimas, do trabalho por Zhang et al. (2007). A fase móvel consistiu em água ultrapura contendo 1% de (Et)₃N e 20% de acetonitrila, em volume. O pH da fase móvel foi ajustado para o valor igual a 7,0 com adição de solução de ácido clorídrico (0,5 mol L⁻¹) até atingir o pH desejado.

3.4.7

Soluções usadas nos experimentos de determinação da GAL usando HPLC com fase reversa com abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica

O preparo da fase móvel aquosa consistiu em dissolver a massa de acetato de sódio em água ultrapura de modo a se atingir concentração final de 10 mmol L⁻¹ seguida da adição de quantidades de (Et)₃N e de propan-2-ol suficientes para se alcançar proporções, em volume, iguais a 0,5% e 2%, respectivamente. O tamponamento em pH 5,0 foi alcançado com adição de volume adequado de solução de ácido acético (0,5 mol L⁻¹).

A solução micelar de SDS que foi adicionada em linha após a coluna cromatográfica foi preparada pela dissolução de uma massa de SDS suficiente para se atingir a concentração final de 100 mmol L⁻¹ em solução de composição idêntica a fase móvel aquosa. O tamponamento em pH 5,0 foi conseguido pela adição de solução de solução de ácido acético (0,5 mol L⁻¹).

As soluções de GAL ($11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) usadas nos estudos foram preparadas diluindo quantidade suficiente de solução estoque em fase móvel aquosa.

3.4.8

Amostras de urina

As amostras de urina foram utilizadas nos ensaios de recuperação dos métodos: (i) de determinação das β -carbolinas, por MLC e MEKC e (ii) de determinação de GAL e seus metabólitos por MLC. As amostras foram fortificadas, em níveis de concentração dentro da faixa linear da curva analítica para cada método, com volumes específicos das soluções estoque das β -carbolinas, da GAL e de seus metabólitos.

As amostras de urina de três voluntários fumantes (com idades entre 30 e 50 anos, sendo dois do sexo masculino e um do sexo feminino) foram utilizadas para se estudar a presença de alcaloides β -carbolinas usando o método por MLC. Já as amostras de urina de um voluntário jovem do sexo masculino (sadio, não fumante e que, na ocasião, não estava sob a prescrição de nenhum medicamento) foram utilizadas para a determinação de alcaloides β -carbolinas por MLC, após o voluntário ter consumido dois comprimidos de medicamento fitoterápico de *Passiflora incarnata* L. As amostras de urina foram coletadas em frascos limpos e secos nos tempos: 0 h (antes da ingestão do medicamento), 1, 2 e 8 h após a administração da dosagem, sem excreção entre as amostragens.

As amostras de urina de três ratos machos da linhagem albina *Wistar*, com idade de dois a três meses, foram coletadas após a administração de medicamento contendo como princípio ativo o hidrobrometo de galantamina. Estas amostras foram utilizadas para a determinação da GAL e de seus metabólitos usando o método por MLC. A solução do medicamento que foi injetada nos ratos foi preparada utilizando uma massa equivalente a 10,60 mg do medicamento dissolvida em 5,00 mL de soro fisiológico. A solução resultante foi ultrasonificada por 10 min e filtrada em uma membrana de PTFE ($0,45\mu\text{m}$) com auxílio de uma seringa comercial. Um volume de 0,5 mL da solução do medicamento foi injetado em cada animal (Figura 18B). As amostras de urina dos

ratos foram coletadas antes da administração do medicamento (ensaio em branco) e após 2 h da administração do medicamento (Figura 18A). Essa coleta foi feita diretamente da bandeja da gaiola dos ratos.

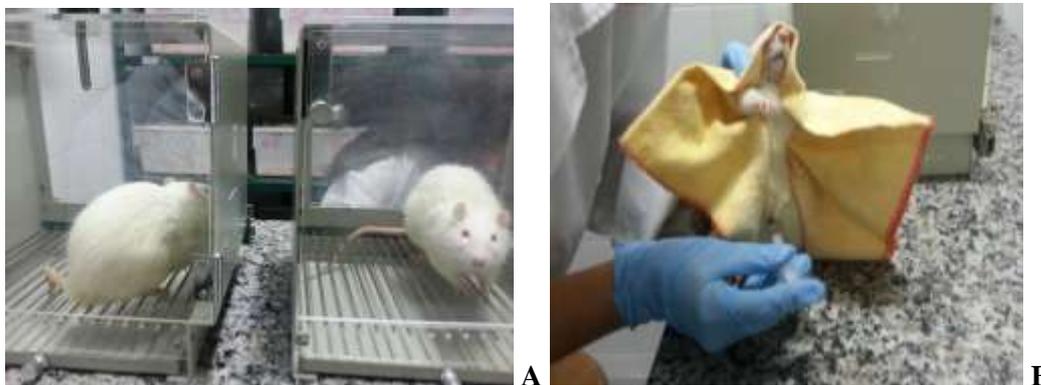


Figura 18. (A) Ratos da linhagem albina *Wistar* na gaiola de observação e coleta (B) e a administração do medicamento contendo hidrobrometo de galantamina.

O preparo das amostras de urina consistiu em adicionar 2 g de sulfato de amônio para cada 10 mL de amostra de urina de modo a forçar a precipitação de proteínas (procedimento de *clean up*) em tubos de centrífugas graduados de 15 mL. As amostras foram submetidas imediatamente à centrifugação (por 15 min e com velocidade de 3000 rpm). Os sobrenadantes foram filtrados em uma membrana de PTFE (0,45 μm) com auxílio de uma seringa comercial (Marques et al., 2008).

Os sobrenadantes das amostras de urina foram diluídos com solução idêntica à fase móvel do método em questão na proporção de 1 parte de sobrenadante para 1,5 partes da fase móvel.

Para os testes de recuperação das β -carbolinas por MEKC, os sobrenadantes da amostra foram diluídas na proporção de 1 parte de sobrenadante para 2 partes de solução tampão borato (pH 9,0), antes da introdução no equipamento de eletroforese capilar.

3.4.9

Amostras de medicamento fitoterápico *P. incarnata* L. e de *P. alata* Dryander

Dois comprimidos do medicamento fitoterápico de *Passiflora incarnata* L. (quantidade equivalente a uma dosagem) foram macerados e dissolvidos em 20,00 mL de metanol. A solução foi ultrassonificada por 120 min e, em seguida, submetida à centrifugação (por 15 min com rotação de 3000 rpm). A amostra foi diluída em solução idêntica à fase móvel micelar adequada para o método de determinação das β -carbolinas, na proporção de 1 parte do sobrenadante para 1,5 partes da fase móvel.

As amostras de tintura (solução alcoólica) de *P. incarnata* L. foram utilizadas na determinação dos alcaloides com o método por MLC. Os volumes das amostras equivalentes as dosagens mínima (20 gotas – 1,00 mL) e máxima (30 gotas – 1,50 mL) foram diluídas em solução idêntica a fase móvel micelar adequada para o método nas proporções 1 parte de tintura para 4 partes de fase móvel e 1,5 partes para 3,5 partes de fase móvel.

Amostras de extrato seco, equivalente a dois saches, de chá misto de Maracujá contendo *P. alata* Dryander, foram utilizadas para a determinação dos alcaloides β -carbolinas. O extrato foi dissolvido em 20,00 mL de metanol, ultrassonificado por 60 min e, em seguida, submetida à centrifugação (durante 5 min a 3000 rpm). O sobrenadante foi pré-concentrado num fator de seis vezes por meio da evaporação auxiliada com vazão de nitrogênio, e posterior diluição na fase móvel micelar adequada na proporção de 1 parte de amostra de chá para 2 partes de fase móvel.

3.4.10

Amostras do medicamento com o princípio ativo hidrobrometo de galantamina

As amostras do medicamento cujo princípio ativo era o hidrobrometo de galantamina foram utilizadas no estudo de comparação entre os métodos de determinação da GAL por MLC e por HPLC de fase reversa. As amostras do

medicamento equivalente a três cápsulas foram maceradas e divididas em cinco partes para o preparo das cinco réplicas autênticas. Cada parte foi dissolvida em metanol, ultrasonificada por 10 min e filtrada em uma membrana de PTFE (0,45 μm) com auxílio de uma seringa comercial. As soluções foram diluídas na proporção de 1 parte de amostra para 4 partes de solução idêntica a fase móvel de composição estabelecida para cada método.

3.4.11

Amostras de água

As amostras de água do riacho localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro foram coletadas em frascos secos e limpos de polipropileno de 50 mL. Essas amostras foram fortificadas com GAL e utilizadas nos ensaios de recuperação da abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica. As amostras de água foram fortificadas com quantidades conhecidas de soluções estoque de GAL (em níveis de concentração dentro da faixa de trabalho estabelecida para o método) e diluídas na proporção 1 parte de amostra para 4 partes de solução idêntica a fase móvel aquosa adequada para o método.

3.5

Procedimentos

3.5.1

Medições Espectrofotométricas

As medidas de fluorescência de soluções GAL foram realizadas para a determinação do fator de enriquecimento micelar da fluorescência da GAL em meio rico em micelas de SDS. Uma banda espectral de passagem de 10 nm e velocidade de varredura de 1200 nm mm^{-1} foram escolhidas.

As varreduras espectrais de absorvância foram feitas nas soluções de β -carbolinas, para a determinação da constante ácida (pK_{am}) em meio micelar de SDS usando velocidade de varredura de 5500 nm min^{-1} e banda espectral de passagem de 1 nm.

3.5.2

Procedimentos Gerais

Todas as fases móveis aquosas, com ou sem a presença do surfactante SDS, água ultrapura e solventes orgânicos foram filtrados em membrana de fibra de vidro ($0,22 \mu\text{m}$) com auxílio de um sistema de filtração e uma bomba de vácuo. As soluções foram posteriormente desgaseificadas por 30 min em banho ultrassônico.

As soluções-padrão dos analitos e as amostras foram filtradas em uma membrana PTFE ($0,45 \mu\text{m}$) com auxílio de uma seringa comercial de 5 mL e transferidas para vials antes da introdução nos cromatógrafos ou em copos de polipropileno antes da introdução no sistema de eletroforese capilar.

3.5.3

Separação e quantificação das β -carbolinas por MLC

A separação dos alcaloides da classe das β -carbolinas foi realizada em uma coluna cromatográfica C18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$ e diâmetro médio das partículas de $5 \mu\text{m}$). A fase móvel micelar otimizada consistiu de tampão fosfato (10 mmol L^{-1} ; pH 8,0) contendo SDS (220 mmol L^{-1}) e $(\text{Et})_3\text{N}$ (0,5 %, em volume)/acetonitrila (97/3 v/v). A acetonitrila e a fase móvel micelar foram colocadas em frascos separados e misturadas no sistema. A eluição da fase móvel foi feita de modo isocrático com a vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura do forno da coluna mantida constante a 25°C . O volume de injeção foi $20 \mu\text{L}$. Os analitos foram detectados pela medição de fluorescência, usando diferentes valores de comprimentos de onda em função do tempo de retenção. Os pares $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, em

nm, de detecção para os alcaloides, foram: HOL 356/410, HLOL 356/500, HAE 370/447, NOR 370/435, HIE 370/416 e HLINE 370/495.

A construção da curva analítica consistiu em sete níveis de concentração na faixa indicada: HOL (4,2 a 420,7 ng g⁻¹), HLOL (1,8 a 409,0 ng g⁻¹), HAE (2,2 a 181,4 ng g⁻¹), NOR (3,9 a 833,0 ng g⁻¹), HIE (4,4 a 1695,9 ng g⁻¹) e HLINE (2,1 a 1277,0 ng g⁻¹).

3.5.4

Determinação das β -carbolinas por MEKC

As determinações por MEKC foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (52 cm até o detector) e 75 μ m de diâmetro interno, devidamente adaptado ao alinhador e ao cassete que protege o capilar. A diferença de potencial aplicada durante a corrida foi de 25 kV e a temperatura mantida constante em 25°C. As injeções das amostras no capilar foram realizadas pelo modo hidrodinâmico (pressão de 50 mbar por 75 s) para realizar pré-concentração dos analitos no capilar pela abordagem de empilhamento. A detecção foi realizada pela medida da absorvância em 383 nm para detecção do HLINE e em 241 nm para os demais alcaloides. As curvas analíticas foram construídas com soluções padrões numa faixa de concentração por massa entre 2,0 a 39 μ g g⁻¹.

3.5.5

Separação e quantificação da GAL e seus metabólitos por MLC

A separação da GAL e de seus principais metabólitos foi realizada em uma coluna cromatográfica C18 (4,6 x 150 mm e diâmetro médio das partículas 5 μ m e porosidade de 300 angstroms). A fase móvel micelar consistiu em solução tampão acetato (10 mmol L⁻¹; pH 5,0) contendo SDS (25 mmol L⁻¹) e 0,5 %, em volume, de (Et)₃N/acetonitrila (97/3 v/v). A mistura entre a fase móvel aquosa e a acetonitrila foi feita no sistema cromatográfico. A eluição da fase móvel foi feita

de modo isocrático com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura do forno da coluna mantida constante a 25°C . O volume de injeção foi $40 \text{ }\mu\text{L}$. Os analitos foram detectados pela medição de fluorescência e o par de $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ de detecção para GAL e seus metabólitos foi $285/330 \text{ nm}$. A curva analítica foi construída a partir de diferentes volumes de injeção (5 a $100 \text{ }\mu\text{L}$) em nove níveis de massa injetada na faixa: NOx ($7,0$ a $158,1 \text{ ng}$), OD ($17,8$ a $356,3 \text{ ng}$), GAL ($6,0$ a $120,7 \text{ ng}$), ND ($6,2$ a $123,3 \text{ ng}$) e EP ($4,0$ a $80,1 \text{ ng}$).

3.5.6

Método cromatográfico de fase reversa usado na comparação de resultados de determinação de GAL

A determinação da GAL foi realizada em uma coluna cromatográfica C18 (dimensões iguais a $4,6 \times 150 \text{ mm}$ e diâmetro médio das partículas de $5 \text{ }\mu\text{m}$) mantida sob temperatura constante de 30°C . A fase móvel consistiu em solução aquosa contendo 1% de $(\text{Et})_3\text{N}$ e 20% de acetonitrila, em volume, e $\text{pH } 7,0$ ajustado com solução de HCl. A eluição foi feita em modo isocrático com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$. Os pares $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ utilizados para a detecção da GAL foram: $290/320$. O tempo de retenção da GAL foi de $5,6$ minutos. A curva analítica foi construída em cinco pontos de massa injetada na faixa de $11,5$ a $1149,4 \text{ ng}$.

3.5.7

Determinação do fator de enriquecimento micelar

As condições experimentais estabelecidas para o método proposto por MLC para separação de GAL e seus metabólitos foi adaptado, para fins comparação, para a abordagem por HPLC de fase reversa. Apenas a GAL foi usada para esse estudo.

As determinações da GAL por MLC e por HPLC foram reproduzidos utilizando o mesmo cromatógrafo líquido (Agilent) e o mesmo par de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ para detecção de fluorescência (285/330 nm).

A faixa de massa injetada, de 11,5 a 1149,4 ng, foi a mesma para a construção das curvas analíticas obtidas por ambos os métodos, MLC e HPLC, a partir de diferentes volumes de injeção (1 a 100 μL).

3.5.8

Estudo do fator de enriquecimento do sinal fluorescente da GAL usando HPLC em fase reversa com abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica

O estudo do fator de enriquecimento micelar para a GAL foi realizado em uma coluna cromatográfica C18 (dimensões igual a 4,6 x 150 mm e diâmetro médio das partículas de 5 μm) mantida sob temperatura constante de 25°C.

A fase móvel consistiu em solução tampão acetato (10 mmol L⁻¹; pH 5,0) contendo 0,5% de (Et)₃N e 2% de propan-2-ol, em volume/acetoneitrila (80/20% v/v). A solução micelar, adicionada após a separação cromatográfica, consistiu em solução tampão acetato (10 mmol L⁻¹; pH 5,0) contendo SDS (100 mmol L⁻¹), 0,5% de (Et)₃N e 2% de propan-2-ol, em volume.

Para a adição de solução micelar em linha, após a coluna cromatográfica, foi necessário o uso de duas bombas de alta pressão, sendo uma bomba principal e uma secundária. A relação entre as vazões das bombas principal/secundária foi igual a 0,5/1,0 mL min⁻¹ e a mistura realizada na mola de reação. Para a determinação do fator de enriquecimento micelar, estudos também foram realizados substituindo a solução micelar por uma solução aquosa de composição idêntica a fase móvel (sem a presença de acetoneitrila). Em ambos os casos, o par de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de detecção para GAL foi 285/330 nm.

As curvas analíticas obtidas com a mistura de fase móvel rica em micelas de SDS e de fase móvel sem SDS, em linha e após separação cromatográfica, foram construídas a partir de dez volumes de injeção (1 a 100 μL) da mesma concentração de solução padrão de GAL (2,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com faixa de massa injetada de 2,9 a 287 ng.

