6.

Conclusões

6.1

Determinação de seis alcaloides β -carbolinas utilizando cromatografia líquida micelar com detecção fluorimétrica

Com o objetivo de determinar seis alcaloides β -carbolinas utilizando a técnica de cromatografia líquida micelar (MLC) com detecção fluorimétrica foi desenvolvido um método para separação de seis alcaloides, harmol, harmalol, harmane, norharmane, harmine e harmaline. Na literatura há dois trabalhos acadêmicos que propõem a separação desses seis alcaloides. Cepas e co-autores (1996) desenvolveram um método de separação das β -carbolinas por HPLC utilizando derivatização para medição de quimioluminescente pós-coluna dos analitos e Cheng e Mitchelson (1997) propuseram a separação destes alcaloides por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), utilizando SDS, e detecção por absorciometria no UV-vis.

As condições experimentais para o método proposto por MLC foram otimizadas com o objetivo de se conseguir uma melhor resolução entre os picos cromatográficos. Os principais parâmetros cromatográficos que influenciaram a separação dos alcaloides foram: o pH da fase móvel e a concentração do SDS. O par cromatográfico HAE/NOR foi o mais crítico em relação à separação. O tempo total de análise foi de 30 min. A composição da fase móvel otimizada para o método foi solução tampão pH 8,0 contendo SDS (220 mmol L^{-1})/acetonitrila (97/3% v/v).

Os valores absolutos do LOD e LOQ ficaram na faixa de $0,03$ e $0,06 \text{ ng g}^{-1}$ e $0,04$ a $0,09 \text{ ng g}^{-1}$. O comportamento linear foi avaliado também pelo comportamento aleatório dos resíduos padronizados, indicando que as variâncias foram homocedásticas. Comparando os coeficientes angulares, o método proposto se mostrou mais sensível para HLINE e menos para NOR. A repetibilidade e a precisão intermediária encontram-se abaixo de 5%, indicando uma boa precisão do método por MLC. As incertezas foram estimadas e resultaram em valores menores que 8% para todos os analitos.

Os testes de interferência para os alcaloides foram realizados e os pares considerados críticos foram HOL/HLOL e HAE/NOR. A presença do HOL não influencia na quantificação de HLOL, porém a quantificação do HOL é prejudicada quando este alcaloide está presente em quantidade quatro vezes menor que HLOL. O par mais crítico foi o HAE/NOR, onde razões limites para a quantificação da NOR seria entre 1:15,4 e 1:0,09. Para os demais pares avaliados, NOR/HIE e HIE/HLINE, não foi observada interferência mútua.

O método proposto por MLC foi comparado ao método por MEKC e os testes de recuperação foram realizados. As médias obtidas foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste t presumindo variâncias diferentes. O resultado da ANOVA para as variâncias entre os métodos, no menor nível de concentração testado foi reprovada, enquanto que para o maior nível a igualdade estatística das variâncias entre os métodos foi comprovada pela ANOVA. O método proposto apresentou desvios de até 88 % menores que o método por MEKC, portanto, conclui-se que o método por MLC possui maior precisão que o método por MEKC.

A aplicação do método proposto por MLC foi realizada em amostras de urina de três voluntários fumantes e em nenhuma dessas amostras foram detectados picos relativos aos alcaloides β -carbolinas. Além dessa amostra, o método foi aplicado em amostras de medicamento fitoterápico e tintura de *Passiflora incarnata*. Nessas amostras o alcaloide HOL foi identificado e quantificado, e o HIE foi detectado apenas na amostra de medicamento. Estima-se que em um comprimido do medicamento há 377 ng de HOL. Um voluntário sadio e não-fumante ingeriu uma dosagem recomendada pelo fabricante e 8 horas após a ingestão do medicamento, o pico do HOL foi identificado e quantificado. Estima-se que o voluntário excretou 276 ng do alcaloide, e essa massa representa 73% do valor estimado do alcaloide presente em uma dosagem do medicamento. As duas dosagens de tintura recomendadas para um paciente, 20 e 30 gotas, foram analisadas pelo método proposto e os valores de massa para HOL foram respectivamente 103 e 165 ng. Na análise da amostra de chá misto de Maracujá (contendo *Passiflora alata* Dryander) os alcaloides norharmane, harmine e harmaline foram identificados. Estima-se que em cada sachê há o equivalente a 109 ng de NOR e 72 ng de HIE. Quanto ao HLINE foi possível apenas a sua detecção. Grice e colaboradores (2001) identificaram e quantificaram, por

HPLC, os flavonóides vitexina e isovitexina e os alcaloides HOL, HAE e HIE em 9 amostras diferentes de *P. incarnata* originárias da Austrália. Em nenhuma amostra foi determinado HOL, porém HAE foi identificado em quase todas as amostras em níveis significativos, enquanto que HIE teve uma variabilidade ampla entre as amostras. Os autores justificaram a ausência e a presença dos alcaloides pelo estágio de desenvolvimento que a planta apresentava quando foi colhida.

Comparando os volumes dos solventes orgânicos consumidos durante a corrida cromatográfica, além do tempo de estabilização do sistema após o gradiente de eluição, o método proposto neste trabalho apresentou o menor gasto (redução de até 98%) de solvente, que foi de 0,54 mL de acetonitrila contra 30 mL para uma metodologia desenvolvida por Herraiz (2004) para separação de HAE e NOR, apenas, diminuindo custos e diminuindo a toxicidade dos resíduos da análise.

Os valores de ALOD e ALOQ estão entre os limites descritos na literatura, sendo que o trabalho de Yritia et. al. (2002) apresentou os menores valores de ALOD e ALOQ, 0,03 ng contra 0,09 ng para HIE determinado neste trabalho. Apenas o método proposto por MLC apresentou a estimativa da incerteza associada à quantificação dos alcaloides.

Finalmente, o método proposto pode ser recomendado para a quantificação das seis β -carbolinas por promover a separação adequada entre os alcaloides e possuir linearidade, precisão, exatidão, e valores estimados compatíveis para as incertezas associadas.

6.2

Determinação de galantamina e seus quatro metabólitos principais utilizando cromatografia líquida micelar com detecção fluorimétrica

A galantamina e seus principais metabólitos, *N*-óxido galantamina, *O*-desmetil galantamina, galantamina, *N*-desmetil galantamina e epigalantamina foram determinados utilizando a técnica de MLC com detecção fluorimétrica.

O processo de otimização das condições experimentais para o método proposto por MLC foi orientado baseado no objetivo de obter uma melhor resolução entre os picos

cromatográficos em menor tempo total de corrida possível. Os principais parâmetros cromatográficos que influenciaram a separação dos alcaloides foram: o pH da fase móvel, a concentração do SDS e a porcentagem de ACN. A composição da fase móvel otimizada para o método foi solução tampão em pH 5,0 contendo SDS (25 mmol L⁻¹)/ACN (97/3% v/v). Além desses parâmetros, a influência do aumento da porosidade da fase estacionária, de 120 para 300 angstroms, foi avaliada. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da porosidade diminui a exclusão estérica das micelas nos poros da sílica e com isso, aumenta a força de eluição da fase móvel, melhorando o perfil cromatográfico (eficiência) em MLC. O par dos analitos GAL e ND foi o mais crítico em relação à separação. O tempo total de análise foi de 17,5 min.

Os parâmetros analíticos de mérito do método foram obtidos e um teste de interferência entre GAL/ND/EP foi realizado. O método se mostrou mais sensível para EP e menos para OD, com inclinação da curva analítica para EP 15 vezes maior.

Os valores absolutos de LOD e o LOQ ficaram na faixa de 2,8 e 12,4 ng e 3,9 a 17,1 ng, respectivamente. Os valores de ALOD e ALOQ diferem dos limites descritos na literatura, sendo que o método proposto por Maláková et al. (2007) apresentou os menores valores absolutos de LOD e LOQ na faixa de 0,05 a 0,2 ng e 0,35 e 0,8 ng. Culzoni et. al. (2012) obtiveram valores de ALOD e ALOQ na faixa de 0,8 a 1,2 e 2,4 a 3,6 ng. A discrepância nos valores de ALOD e ALOQ do método proposto por MLC em relação aos descritos na literatura se deve ao procedimento adotado para a obtenção desses parâmetros de mérito. Maláková et al. (2007) determinou os limite de detecção utilizando os parâmetros da curva analítica para cada analito. O LOD foi calculado por três vezes a razão do desvio do coeficiente angular pelo coeficiente angular. Culzoni et al. (2012) obteve os valores de LOD utilizando métodos quimiométricos para determinação dos parâmetros de mérito. Apenas o método proposto por MLC apresentou a estimativa da incerteza associada à quantificação de GAL e seus metabólitos.

O comportamento linear foi avaliado também pelo comportamento aleatório dos resíduos padronizados, indicando que as variâncias eram homocedásticas. A repetibilidade e a precisão intermediária, avaliadas encontram-se abaixo de 4%, indicando uma boa precisão do método por MLC. As incertezas foram e resultaram em

valores menores que 11% (valor obtido para o menor nível de massa injetada) para todos os analitos.

Os testes de interferência foram realizados com o intuito de conhecer a proporção máxima de concentração entre os analitos GAL, ND e EP, sendo o par considerado mais crítico foi GAL/ND. Diante dos resultados, a proporção limite para esse par foi de 1:1, sendo que os dois analitos estavam presentes no maior nível de massa injetada para ambos. Além disso, foi possível concluir que a presença de GAL, em níveis superiores de massa injetada, interfere significativamente a quantificação confiável do ND, especialmente, quando o metabólito está presente em quantidades menores. Para o par avaliado ND/EP não foi observada interferência entre eles na quantificação da massa injetada desses analitos.

A recuperação do método proposto foi avaliada em amostra de urina e os resultados obtidos ficaram entre 91,4 e 114,8 %.

O método proposto por MLC foi comparado ao método baseado na cromatografia líquida de fase reversa de para a determinação de GAL, utilizando amostra de medicamento contendo, como princípio ativo, o hidrobrometo de galantamina. As médias dos teores da galantamina, presente no medicamento, obtidas pelos dois métodos foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste t, presumindo variâncias iguais. A igualdade estatística das variâncias entre os métodos foi comprovada pela ANOVA. O método proposto por MLC se apresentou mais sensível, em até 1,8 vezes, que o método por HPLC de fase reversa, porém o LOD e o LOQ obtidos para o método por HPLC foi em até 2,7 vezes menor que o método proposto.

A aplicação do método proposto por MLC foi realizada em amostras de urina ratos após a administração do medicamento contendo hidrobrometo de galantamina. A galantamina e os metabólitos *N*-óxido de galantamina e *N*-desmetil galantamina foram identificados e quantificados em 24 ng, 206,6 ng e 17,4 ng, respectivamente. A via metabólica para a formação do NOx foi a predominante nesse estudo.

Na literatura são descritos vários métodos para a determinação de GAL por HPLC, porém para a determinação de GAL e seus metabólitos há um número reduzido de métodos propostos. Comparando os volumes dos solventes orgânicos consumidos durante a corrida cromatográfica, além do tempo de estabilização do sistema após o gradiente de

eluição, o método proposto neste trabalho apresentou o menor gasto (redução de até 95%) de solvente, que foi de 0,42 mL de acetonitrila contra 8,3 mL para uma método proposto por Maláková et al. (2007) para separação de GAL e os seus principais metabólitos, diminuindo custos e a toxicidade dos resíduos da análise. Culzoni et al. (2012) propuseram um método de determinação da GAL e seus metabólitos por HPLC - MCR-ALS e o gasto de acetonitrila foi de 0,79 mL.

Em suma, o método proposto por MLC pode ser recomendado para a quantificação da GAL e seus principais metabólitos por proporcionar a separação adequada entre os analitos e possuir linearidade, precisão, exatidão, e valores estimados compatíveis com as incertezas associadas.

6.3

Determinação do fator de enriquecimento micelar da galantamina utilizando o meio organizado de SDS e detecção fluorimétrica

O fator de enriquecimento micelar (MEF) da GAL em meio de SDS foi avaliado em dois sistemas distintos utilizando detecção fluorimétrica, são eles: i) espectrofluorimetria e ii) formação de fase micelar em linha em HPLC de fase reversa.

As medidas do sinal fluorescente da GAL foram realizadas em solução tamponada com acetato (pH 5,0) contendo SDS (100 mmol L^{-1}). A forma protonada (carregada positivamente) da GAL, predominantemente nesse pH, interage eletrostaticamente com as micelas de SDS, carregadas negativamente. O uso de micelas de SDS para determinação da GAL por espectrofluorimetria resultou em um ganho do sinal fluorescente de quatro vezes.

As condições experimentais definidas para a determinação de GAL por HPLC com fase reversa usando a abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna foram: fase móvel aquosa composta por solução tamponada (pH 5,0) contendo 2% de propan-2-ol/ACN (80/20% v/v). A solução rica em micelas de SDS adicionada após a coluna foi composta por solução tamponada (pH 5,0) contendo SDS (100 mmol L^{-1}) 2% de propan-2-ol. A fase móvel foi eluída no modo isocrático. A

relação entre as vazões da bomba principal (eluição da fase móvel) e da bomba secundária (eluição da solução rica em micelas de SDS) foi igual a 0,5/1,0 mL min⁻¹. O tempo de retenção da GAL foi igual a 3,6 min.

Os parâmetros analíticos de mérito para o método por HPLC em fase reversa com adição de solução com e sem a presença de micelas de SDS foram obtidos e os valores absolutos de LOD e o LOQ foram ficaram na faixa de 1,6 a 1,0 ng e 2,4 a 1,6 ng, respectivamente. As equações para as curvas analíticas foram determinadas por regressão linear e o R² ajustado se aproximou de 1 para ambas as abordagens. O comportamento linear foi avaliado também pelo comportamento aleatório dos resíduos padronizados, indicando que as variâncias eram homocedásticas. A repetibilidade e a precisão intermediária, avaliadas para ambas as abordagens encontram-se abaixo de 2%, indicando uma boa precisão. O método por HPLC com adição de solução rica em micelas de SDS se mostrou mais sensível que o método com adição de solução sem micelas, com inclinação da curva analítica três vezes maior. A recuperação, entre 95 a 99,7%, do método por HPLC com adição de solução rica em micelas de SDS foi realizada em água de riacho fortificada com solução padrão de GAL.

A abordagem proposta por adição de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica se mostrou adequada para determinação de GAL com detecção fluorimétrica e possuir sensibilidade, linearidade, precisão e extidão.

O meio organizado composto por micelas de SDS promoveu o ganho de sinal fluorescente da GAL em 4; 3 e 1,8 vezes, respectivamente, por espectrofluorimetria, por HPLC com adição de solução micelar em linha após a coluna e por MLC. Portanto, o uso de micelas, como meio organizado, é promissor em determinações de substâncias que exibem baixa fluorescência, como é o caso da GAL, em metodologias de separação.