

**Ana Paula Lamounier**

**Desenvolvimento de métodos utilizando cromatografia líquida micelar (MLC) com detecção fluorimétrica para a determinação de seis alcaloides  $\beta$ -carbolinas e para galantamina em presença dos seus principais metabólitos**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio  
Co-orientador: Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro,  
Janeiro de 2015



**Ana Paula Lamounier**

**Desenvolvimento de métodos utilizando cromatografia líquida micelar (MLC) com detecção fluorimétrica para a determinação de seis alcaloides  $\beta$ -carbolinas e para galantamina em presença dos seus principais metabólitos**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof. Ricardo Queiroz Aucélio**

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof. Aderval Severino Luna**

Co-orientador

UERJ

**Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha**

Departamento de Química da PUC-Rio

**Prof. Arnaldo Alves Cardoso**

UNESP

**Dr. Arthur de Lemos Scofield**

Departamento de Química – PUC-Rio

**Profa. Aurora Pérez Gamatges**

Departamento de Química – PUC-Rio

**Profa. Monica Costa Padilha**

UFRJ

**Prof. Raphael Maia de Almeida Bento**

IFRJ

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 14 de janeiro de 2015

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem a autorização prévia da universidade, da autora e da orientadora.

### **Ana Paula Lamounier**

Licenciada pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2002, possui Mestrado em Química pela Universidade Federal de Minas Gerais (2004), com ênfase em Química Analítica. Professora de Química Analítica Quantitativa e Análise Instrumental do Instituto Federal do Rio de Janeiro.

### Ficha Catalográfica

Lamounier, Ana Paula

Desenvolvimento de métodos utilizando cromatografia líquida micelar (MLC) com detecção fluriométrica para a determinação de seis alcaloides  $\beta$ -carbolinas e para a galantamina em presença dos seus principais metabólitos / Ana Paula Lamounier; orientador: Ricardo Queiróz Aucélio ; co-orientador: Aderval Severino Luna. – 2015.

294 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2015.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. MLC. 3.  $\beta$ -carbolinas. 4. Galantamina. 5. Metabólitos. I. Aucélio, Ricardo Queiróz. II. Luna, Aderval Severino. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Para o Humberto,  
companheiro de uma vida

Para meus pais, Ana Maria e José Nicodemos, e para o meu irmão,  
Leandro, por sempre me lembrarem que eu posso alçar vôos maiores.

Obrigada!

## Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Aucélio, por acreditar no meu trabalho e financiá-lo. Obrigada pelo conhecimento transmitido, pela compreensão da minha longa ausência e pela paciência.

À Alessandra, que nunca se limitou a função de co-orientadora e se tornou uma amiga presente na minha vida. Obrigada pela orientação constante na pesquisa, pela rica troca de experiências e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos comigo.

Ao meu co-orientador, Prof. Luna, por me abrir as portas do seu laboratório na UERJ, por me mostrar o mundo de possibilidades da quimiometria e as longas conversas sobre a experiência de lecionar. E por falar na UERJ, agradeço aos meninos Igor, Arnaldo e Diego pela amizade e auxílio no laboratório.

À equipe do LEEA, em especial, ao Paulo que sempre esteve à disposição para me auxiliar em tudo que eu precisei.

Aos professores que participaram da minha banca de defesa.

Aos amigos, que fiz durante o doutorado, Cabrini, Sarzamin, Juan, Eliane e Mônica. Obrigada pela companhia nos vários fins de semana de trabalho no laboratório e nos cafés.

À minha grande família, tios, tias, primos, primas e meus queridos afilhados, Letícia e Guilherme, que eu amo tanto. Agradeço por fazer parte dessa família muito unida e por receber o apoio constante de vocês. Agradeço também a minha sogra, Dirce, que se tornou parte da minha família. Obrigada pela torcida.

Aos meus colegas das equipes de Quantitativa e Análise Instrumental do IFRJ.  
Obrigada pelo incentivo na realização desse trabalho.

Agradeço à Fátima, secretária da Pós, por sempre me acolher com muito carinho.  
Sempre disponível para os alunos aflitos.

À equipe do Biotério, que me cederam e manusearam os ratinhos para a execução  
desse trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da PUC-Rio, sempre solícitos e competentes em  
atender os meus pedidos por artigos antigos.

E, por fim, mas não menos importante, aos meus alunos de iniciação científica,  
Nathan e Bárbara, que foram meus alunos no curso técnico em Química. Muito  
obrigada pelo auxílio nos experimentos, pela companhia no laboratório e pela  
amizade.

À PUC-Rio pelo financiamento.

## Resumo

Lamounier, Ana Paula; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento de métodos utilizando Cromatografia Líquida Micelar (MLC) com detecção fluorimétrica para a determinação de seis alcaloides  $\beta$ -carbolinas e para a galantamina em presença dos seus principais metabólitos.** Rio de Janeiro, 2015. 294p. Tese de Doutorado. Departamento de Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Métodos baseados na cromatografia líquida micelar (MLC) com detecção fluorimétrica foram desenvolvidos para dois estudos de caso. No primeiro deles, seis  $\beta$ -carbolinas (harmol, harmalol, harmane, norharmane, harmine e harmaline) foram plenamente separadas de modo a se aplicar o método para a determinação dos alcaloides em formulações de *Passiflora incarnata* L., extrato seco de *Passiflora alata* Dryander e em urina. A separação foi realizada em coluna cromatográfica C18, utilizando fase móvel tamponada (pH 8,0) contendo 220 mmol L<sup>-1</sup> de dodecilsulfato de sódio (SDS)/acetonitrila (97/3% v/v). A detecção fluorimétrica permitiu que se atingissem limites de detecção (LOD) abaixo de 3,6 ng g<sup>-1</sup> com repetibilidade e precisão intermediária entre 0,1 e 5%. As incertezas combinadas associadas à concentração das  $\beta$ -carbolinas ficaram entre 1 e 9%. O método proposto foi comparado ao método baseado na cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) com detecção absorciométrica e os resultados com MLC se mostraram superiores do ponto de vista da capacidade de detecção (por serem os alcaloides naturalmente muito fluorescentes) e de recuperação. Para as amostras de fitoterápicos, o harmol foi quantificado tanto nas amostras de medicamento de *Passiflora incarnata* quanto em urina de voluntário após a administração de fitoterápico. O harmine foi detectado apenas na amostra de medicamento. Os alcaloides norharmane, harmine e harmaline foram identificados no chá misto de Maracujá, no qual continha em sua composição extrato seco de *Passiflora alata* Dryander. Na segunda abordagem, um método por MLC foi desenvolvido para a determinação de galantamina e de seus principais metabólitos (*N*-desmetil galantamina, *O*-desmetil galantamina, epigalantamina e *N*-óxido galantamina). A separação da galantamina e dos metabólitos foi feita utilizando coluna cromatográfica C18 com porosidade de 300 angstroms e fase móvel constituída de tampão (pH 5,0) contendo 25 mmol L<sup>-1</sup> de SDS/acetonitrila (97/3% v/v). A detecção fluorimétrica permitiu limites de detecção abaixo de 343 ng g<sup>-1</sup>,



repetibilidade e precisão intermediária entre 2,2 e 4%. As incertezas combinadas associadas à concentração de galantamina e dos metabólitos ficaram entre 0,3 e 11%. Ensaio de recuperação foram realizados em amostra de urina fortificada com padrões da galantamina e metabólitos e os resultados obtidos ficaram entre de 91,4 e 114,8%. A comparação entre o método por MLC e o método por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa foram feitas com amostras de medicamento cujo princípio ativo era o hidrobrometo de galantamina. Os resultados dos teores de galantamina e as variâncias das medidas obtidas por ambos os métodos foram estatisticamente iguais. A sensibilidade da curva analítica obtida por MLC foi duas vezes maior do que a encontrada por cromatografia por fase reversa. Análises de urina de ratos coletadas após a administração do medicamento foram realizadas com o método proposto, sendo que a galantamina mais os metabólitos *N*-óxido galantamina e *N*-desmetil galantamina foram identificados nas amostras. Para melhor avaliar o efeito de amplificação de fluorescência da galantamina pelo ambiente organizado, experimentos foram feitos com a separação cromatográfica de fase reversa e com a adição de solução rica em micelas de SDS após a passagem do analito pela coluna cromatográfica. As condições de separação incluíram o uso de coluna cromatográfica C18, fase móvel constituída por tampão (pH 5,0) contendo 2% de propano-2-ol (v/v)/ acetonitrila (80/20 % v/v). A solução micelar de SDS (100 mmol L<sup>-1</sup>), misturada à fase móvel após a coluna cromatográfica, foi preparada com a mesma composição da fase móvel. A sensibilidade da curva analítica de galantamina foi três vezes maior quando o meio micelar foi usado. O resultado prova que o ambiente micelar favorece a medição fluorimétrica de galantamina mesmo em regime de fluxo. As recuperações obtidas com e sem a mistura com a solução micelar ficaram entre 97,5 e 102,2%.

## Palavras-chave

Cromatografia líquida micelar; alcaloides  $\beta$ -carbolinas; galantamina e metabólitos; detecção fluorimétrica; urina; extratos fitoterápicos.

## Abstract

Lamounier, Ana Paula; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor). **Micellar liquid chromatography with fluorimetric detection for the determination of six  $\beta$ -carboline alkaloids and galantamine in the presence of its major metabolites.** Rio de Janeiro, 2015, 294p. DSc. Thesis - Departamento de Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Methods based on micellar liquid chromatography (MLC) with fluorimetric detection have been developed for two case studies. In the first, six  $\beta$ -carbolines (harmol, harmalol, harmane, norharmane, harmine and harmaline) were fully separated allowing the application of the method for the determination of these alkaloids in *Passiflora incarnata* L. formulations, in *Passiflora alata* Dryander dry extract and in urine. The chromatographic separation was performed on a C18 column using a buffered mobile phase consisting of disodium hydrogen phosphate (pH 8.0) containing 220 mmol L<sup>-1</sup> of sodium dodecyl sulfate (SDS)/acetonitrile (97/3% v/v). The fluorimetric detection allowed limits of detection (LOD) below than 3.6 ng g<sup>-1</sup> to be achieved with intermediary precision and repeatability between 0.1 and 5%. The calculated combined uncertainties of the concentration of  $\beta$ -carbolines were between 1 and 9%. The proposed method was compared with the method based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with absorptionmetric detection. The MLC results were superior from the viewpoint of the detection power (since they are very fluorescent alkaloids) and also in terms of recovery. The harmol was quantified in *Passiflora incarnata* phitotherapeutic samples and in urine collected from a voluntary after of the administration of herbal medicine. The harmine was detected only in the phitotherapeutic sample. The norharmane, harmine and harmaline alkaloids were identified in Passion Fruit tea, which contained dry extract of *Passiflora alata* Dryander. In the second approach, a method for MLC was developed for the determination of galantamine and its main metabolites (*N*-demethyl galantamine, *O*-demethyl galantamine, epigalantamine and *N*-oxide galantamine). The separation was performed using a C18 chromatography column with porosity of 300 angstroms and with mobile phase consisting of buffer (pH 5.0) containing SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>)/acetonitrile (97/3% v/v). The fluorimetric detection enabled LOD below 343 ng g<sup>-1</sup> with intermediate precision and repeatability between 2.2 and 4%. Combined

uncertainties for concentration of galantamine and metabolites were between 0.3 and 11%. Recovery experiments were performed on urine samples fortified with galantamine standards and metabolites with results between 91.4 and 114.8%. A comparison between the proposed MLC method and reverse phase high performance liquid chromatography was made using medicine samples containing galantamine hydrobromide as the active principle. Galantamine levels and variances achieved with these methods were statistically equal. The analytical curve sensitivity by MLC was two times higher than that found with reverse phase high performance liquid chromatography. Analysis of rat urine, collected after the administration of the medicine, were performed with the proposed method enabling the identification of galantamine, *N*-oxide galantamine and *N*-demethyl galantamine. To better evaluate the fluorescence amplification effect of galantamine in the organized environment, experiments were made with conventional chromatographic separation and post-column addition of the aqueous solution rich in micelles. The separation conditions included the use of C18 chromatographic column, mobile phase consisting of buffer (pH 5.0) containing 2% of propan-2-ol (v/v)/acetonitrile (80/20% v/v). The micellar solution of SDS (100 mmol L<sup>-1</sup>), added after the chromatographic column, was prepared with the same composition of the mobile phase. The column temperature was 25°C and the sample volume was 20 µL. The sensitivity of the analytical curve of galantamine was three times higher when the micellar solution was mixed, proving that the organized environment favors the galantamine fluorescence even at flow regime. Recoveries with or without post-column mixing with the micelle rich solution were between 97.5 and 102.2%.

## Keywords

Micellar liquid chromatography;  $\beta$ -carboline alkaloids; galantamine and metabolites; fluorimetric detection; urine; phytotherapeutic extracts.

## Sumário

1. Contextualização	33
1.1. Objetivos	34
1.2. Estrutura da tese	34
2. Introdução	37
2.1. Alcaloides da classe das $\beta$ -carbolinas	37
2.1.1. Informações gerais	37
2.1.2. Descrição dos principais métodos cromatográficos para determinação de $\beta$ -carbolinas	42
2.1.3. Propriedades ácido-base e fotofísicas das $\beta$ -carbolinas	48
2.1.4. Uso de surfactantes na determinação das $\beta$ -carbolinas	51
2.1.5. Determinação do valor de $pK_a(S_0)$ de substâncias e do $pK_a$ aparente de substâncias em sistema micelares	53
2.2. Galantamina e seus principais metabólitos	56
2.2.1. Informações gerais	56
2.2.2. Metabolização da galantamina	58
2.2.3. Descrição dos principais métodos cromatográficos para determinação de galantamina	59
2.3. Cromatografia líquida micelar – Informações gerais	63
2.3.1. Surfactantes e micelas normais e processo de micelização	63
2.3.2. Cromatografia líquida micelar	67
2.3.3. Mecanismo de retenção em cromatografia líquida micelar	72
2.3.4. Coeficiente de partição	74
2.3.5. O comportamento de retenção em MLC	78
2.3.6. Causas e remediação da baixa eficiência da MLC	93
2.4. Fluorescência	100
2.5. Validação	107
2.5.1. Parâmetros de mérito	107
2.6. Estudos de incerteza	112
2.6.1. Fontes de incerteza	113
2.6.2. Incerteza em relação aos parâmetros da curva analítica	114
2.6.3. Incerteza em relação à repetibilidade e precisão Intermediária	115
2.6.4. Incerteza em relação ao preparo da solução	116
2.6.5. Incerteza combinada ( $u_c$ ) e incerteza expandida ( $U$ )	117

3. Materiais e métodos	119
3.1. Instrumentação	119
3.1.1. Espectrofotômetros	119
3.1.2. Instrumentos usados nas abordagens cromatográficas	119
3.1.3. Equipamentos auxiliares	121
3.2. Padrões e reagentes	122
3.3. Materiais	123
3.4. Soluções	124
3.4.1. Soluções estoque	124
3.4.2. Soluções utilizadas na determinação de $pK_a$ por espectrofotometria no UV-visível	124
3.4.3. Soluções usadas para obter os comprimentos de onda para a medição de fluorescência e do fator de enriquecimento micelar	125
3.4.4. Soluções usadas em cromatografia líquida micelar (MLC)	126
3.4.5. Soluções usadas na cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC)	126
3.4.6. Soluções usadas na cromatografia líquida de fase reversa	127
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	127
3.4.8. Amostras de urina	128
3.4.9. Amostras de medicamento fitoterápico <i>P. incarnata</i> L. e de <i>P. alata</i> Dryander	130
3.4.10. Amostras do medicamento com o princípio ativo hidrobrometo de galantamina	130
3.4.11. Amostras de água	131
3.5. Procedimentos	131
3.5.1. Medições espectrofotométricas	131
3.5.2. Procedimentos gerais	132
3.5.3. Separação e quantificação das $\beta$ -carbolinas por MLC	132
3.5.4. Determinação das $\beta$ -carbolinas por MEKC	133
3.5.5. Separação e quantificação da GAL e seus metabólitos por MLC	133
3.5.6. Método cromatográfico de fase reversa usado na comparação de resultados de determinação de GAL	134
3.5.7. Determinação do fator de enriquecimento micelar	134
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	135

4. Desenvolvimento de método por cromatografia líquida micelar para quantificação de seis alcaloides $\beta$ -carbolinas	137
4.1. Resultados	137
4.1.1. Determinação dos valores de $pK_a$ ( $S_0$ ) das $\beta$ -carbolinas em meio aquoso e em meio aquoso organizado com o surfactante SDS	137
4.1.2. Determinação dos valores de $pK_a$ das $\beta$ -carbolinas por absorciometria	138
4.1.3. Desenvolvimento de método de separação das seis $\beta$ -carbolinas por MLC	143
4.1.4. Estudos preliminares das condições de separação cromatográfica por MLC	144
4.1.5. Estudos da variação da vazão de fase móvel e estabelecimento do programa de detecção em função dos tempos de retenção	146
4.1.6. Estudo da influência da concentração de surfactante	150
4.1.7. Estudo da variação da natureza e da porcentagem do solvente orgânico na fase móvel micelar	152
4.1.8. Estudo preliminar do valor de pH da fase móvel micelar	154
4.1.9. Ajuste da temperatura da coluna cromatográfica	156
4.1.10. Estudo multivariado para ajuste final da concentração de SDS e do valor de pH da fase móvel micelar	156
4.2. Validação do método proposto	165
4.2.1. Estudo de estabilidade das $\beta$ -carbolinas	165
4.2.2. Parâmetros analíticos de mérito	167
4.2.3. Estimativa da incerteza de medição	175
4.2.4. Fontes de incerteza	175
4.2.5. Incerteza associada ao preparo da solução ( $u_{sol}$ )	176
4.2.6. Incerteza associada aos parâmetros da curva analítica ( $u_{curva}$ )	177
4.2.7. Incerteza associada à repetibilidade ( $u_r$ ) e a precisão intermediária ( $u_{pi}$ )	177
4.2.8. Incerteza combinada ( $u_c$ ) e incerteza expandida ( $U$ )	178
4.3. Estudos de interferência	184
4.4. Comparação entre métodos e ensaios de recuperação	192
4.5. Aplicação do método proposto por MLC	200
4.5.1. Urina de fumantes	200
4.5.2. <i>Passiflora incarnata</i> e <i>alata</i>	201
4.5.3. Medicamento fitoterápico de <i>Passiflora incarnata</i> L.	202
4.5.4. Urina de voluntário após a administração de medicamento fitoterápico	203
4.5.5. Tintura de <i>Passiflora incarnata</i>	205
4.5.6. Chá misto de maracujá – <i>Passiflora alata</i> Dryander	206

4.5.7. Quantificação dos alcaloides identificados nas amostras de <i>P. incarnata</i> e <i>P. alata</i> Dryander	208
5. Desenvolvimento de método por cromatografia líquida micelar para quantificação galantamina e seus quatro metabólitos principais	211
5.1. Resultados	211
5.1.1. Separação de galantamina e seus principais metabólitos por MLC	211
5.1.2. Estudo da variação da temperatura da coluna cromatográfica	215
5.1.3. Estudo da influência da natureza e porcentagem do modificador orgânico na fase móvel micelar	216
5.1.4. Estudo da influência do pH da fase móvel	218
5.1.5. Estudo da influência da concentração do surfactante	222
5.1.6. Estudos com fase estacionária com porosidade de 300 Å	224
5.2. Validação do método	230
5.2.1. Parâmetros analíticos de mérito para a quantificação da galantamina e seus metabólitos	231
5.2.2. Estimativa das incertezas associadas ao método	238
5.2.3. Teste de interferência	246
5.2.4. Ensaio de recuperação	251
5.2.5. Comparação entre métodos	253
5.2.6. Aplicação da metodologia em urina de ratos	259
5.3. Estudos do fator de enriquecimento micelar do sinal fluorescente da galantamina	262
5.3.1. Determinação do fator de enriquecimento de sinal da GAL no meio rico em micelas de SDS por espectrofluorimetria	262
5.3.2. Determinação do fator de enriquecimento de sinal da GAL no meio rico em micelas de SDS em regime de fluxo	264
5.3.3. Determinação da GAL usando HPLC com fase reversa e detecção fluorimétrica com abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica	270
6. Conclusões	275
6.1. Determinação de seis alcaloides $\beta$ -carbolinas utilizando cromatografia líquida micelar com detecção fluorimétrica	275
6.2. Determinação de galantamina e seus quatro metabólitos principais utilizando cromatografia líquida micelar com detecção fluorimétrica	277
6.3. Determinação do fator de enriquecimento micelar da galantamina utilizando o meio organizado de SDS e detecção fluorimétrica	280





## Lista de figuras

Figura 1. Estruturas químicas das $\beta$ -carbolinas.	37
Figura 2. Condensação de tripamina formando algumas $\beta$ -carbolinas (adaptado de Tsuchiya, 2004).	39
Figura 3. Proposta de via metabólica para harmane e harmine (adaptado de Guan, 2001).	40
Figura 4. Esquema do equilíbrio ácido-base para $\beta$ -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).	49
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*).	51
Figura 6. Esquema de diferentes espécies presentes no equilíbrio de transferência de prótons de $\beta$ -carbolinas HIE.	53
Figura 7. Estrutura química da galantamina (GAL).	56
Figura 8. Estrutura molecular dos principais metabólitos da galantamina: <i>N</i> -óxido galantamina (NOx), <i>O</i> -desmetil galantamina (OD), <i>N</i> -desmetil galantamina (ND) e epigalantamina (EP).	59
Figura 9. Representação bidimensional das regiões que formam uma micela iônica normal com estrutura esférica (Modelo de Sigter).	65
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.	67
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.	72
Figura 12. Representação esquemática dos três equilíbrios de partição que ocorrem na eluição de um soluto em MLC.	76
Figura 13. Equilíbrio de distribuição do soluto-micela e soluto-fase estacionária na fase móvel micelar com modificador orgânico.	89
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.	102
Figura 15. Esquema da protonação, desprotonação, excitação e fluorescência de moléculas orgânicas que possuem caráter ácido-base.	104
Figura 16. Diagrama de causa e efeito para a determinação da concentração real das $\beta$ -carbolinas.	113
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).	121

Figura 18. (A) Ratos da linhagem albina *Wistar* na gaiola de observação e coleta (B) e a administração do medicamento contendo hidrobrometo de galantamina. 129

Figura 19. Espectros de absorção da HAE em diferentes valores de pH, em meio aquoso sem surfactante (A) e em meio aquoso rico em micelas de SDS (B). 141

Figura 20. Espectros de absorção da NOR em diferentes valores de pH, em meio aquoso sem surfactante (A) e em meio aquoso rico em micelas de SDS (B). 141

Figura 21. Espectros de absorção do HIE em diferentes valores de pH, em meio aquoso sem surfactante (A) e em meio aquoso rico em micelas de SDS (B). 141

Figura 22. Injeções individuais de HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE de concentração  $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%, em volume,  $(\text{Et})_3\text{N}/\text{ACN}(95/5 \text{ v/v})$ . Volume de amostra introduzida de  $20 \mu\text{L}$  e vazão igual a  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura da coluna a  $25^\circ\text{C}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcalóides foram HOL 334/419, HLOL: 378/479, HAE: 370/435, HIE: 342/416, NOR: 374/447 e HLINE: 382/467 nm. 146

Figura 23. Cromatogramas da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas, HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE de concentração  $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , variando a vazão de fase móvel:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  (A) e  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  (B). Composição da fase micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5%, em volume, de ACN. Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de amostra introduzida de  $20 \mu\text{L}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL 356/410, HLOL: 356/500, HAE: 370/435, NOR: 370/447, HIE: 370/416 e HLINE: 370/495 nm. 147

Figura 24. (a) Cromatograma da injeção de uma mistura dos seis alcaloides de concentrações iguais a  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para HOL e HLOL e demais analitos iguais a  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . (b) Destaque do cromatograma na região do HOL e HLOL em diferentes canais de detecção por fluorescência: 356/479 nm (A), 356/419 nm (B), 356/410 nm (C) e 356/500 nm (D). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5%, em volume, de ACN. Volume de amostra introduzida de  $20 \mu\text{L}$ , vazão igual a  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura da coluna a  $25^\circ\text{C}$ . 149

Figura 25. Cromatogramas da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , variando a concentração do SDS:  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  (A),  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  (B) e  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  (C). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0), contendo SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5%, em volume, de ACN. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de amostra introduzida de  $20 \mu\text{L}$  em todas as injeções. Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/ HLINE: 370/435 nm. 151

Figura 26. Cromatogramas da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  comparando duas proporções de ACN:

20% (A) e 5% (B). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e ACN. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$  em todas as injeções. Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

153

Figura 27. Cromatogramas obtidos para cada uma das seis  $\beta$ -carbolinas, na concentração de  $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5% de ACN em volume. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de injeção  $20 \mu\text{L}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL 356/410, HLOL: 356/500, HAE: 370/435, NOR: 370/447, HIE: 370/416 e HLINE: 370/495 nm.

155

Figura 28. Cromatogramas de uma mistura de soluções padrão das seis  $\beta$ -carbolinas, na concentração  $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , em função do pH da fase móvel micelar: 3,0 (A) e 5,0 (B). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5% de ACN, em volume. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de injeção  $20 \mu\text{L}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/ HLINE: 370/435 nm.

155

Figura 29. Superposição de cromatogramas obtidos da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (a) e a região aumentada (b) do HAE/NOR variando a temperatura da coluna,  $^\circ\text{C}$ : 40 (A), 30 (B) e 25 (C). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0), contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 5% de ACN, em volume. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção  $20 \mu\text{L}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/419, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/447 nm.

156

Figura 30. Cromatogramas obtidos de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes fases móveis micelares: Fase 2:  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e pH 7,5 (A), Fase 8:  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e pH 8,0 (B) e Fase 4:  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e pH 7,5 (C). Todos os cromatogramas foram gerados em vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ , volume introduzido de amostra de  $20 \mu\text{L}$ . As proporções de  $(\text{Et})_3\text{N}$  e de ACN foram 0,5% e 5%, respectivamente. Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

161

Figura 31. Superposição dos cromatogramas resultantes das injeções de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  em duas fases móveis distintas:  $220 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e pH 8,0 (A) e  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e pH 8,0 (B). Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ , volume introduzido de amostra de  $20 \mu\text{L}$ . As proporções de  $(\text{Et})_3\text{N}$  e de ACN foram 0,5% e 5%, respectivamente. Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

162

Figura 32. Cromatogramas resultantes das injeções de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas na concentração  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (exceção para

HAE, NOR e HIE, no cromatograma B, cuja concentração foi de  $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  com proporção de ACN (v/v) de 5% (A) e 3% (B).

Composição da fase móvel micelar: tampão fosfato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 8,0), contendo  $220 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e 0,5% de  $(\text{Et})_3\text{N}$ . Vazão  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

163

Figura 33. Cromatogramas resultantes da injeção de uma mistura de padrões das seis  $\beta$ -carbolinas, respectivamente, HOL 11,8 min, HLOL 13,5 min, HAE 17,9 min, NOR 19,3 min, HIE 21,7 min e HLINE 26,3 min com leitura em um detector fotométrico de multicanal: canal A (A), canal B (B), canal C (C), canal D (D) e leitura do ensaio em branco (Br). Fase móvel micelar: tampão fosfato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 8,0), contendo  $220 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5%  $(\text{Et})_3\text{N}$  e 3% de ACN. Vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna  $25^\circ\text{C}$  e volume introduzido de amostra de  $20 \mu\text{L}$ .

163

Figura 34. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para HOL.

169

Figura 35. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para HLOL.

170

Figura 36. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para HAE.

170

Figura 37. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para NOR.

171

Figura 38. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para HIE.

171

Figura 39. Curvas analíticas completa (A) e reduzida (B) e gráfico de resíduos padronizados (C) para HLINE

172

Figura 40. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do HOL por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Componentes da incerteza:  $u_{\text{curva}}$  (curva analítica),  $u_{\text{sol}}$  (preparo da solução),  $u_{\text{pi}}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

180

Figura 41. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do HLOL por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Componentes da incerteza:  $u_{\text{curva}}$  (curva analítica),  $u_{\text{sol}}$  (preparo da solução),  $u_{\text{pi}}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

181

Figura 42. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do HAE por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Componentes da incerteza:  $u_{\text{curva}}$  (curva analítica),  $u_{\text{sol}}$  (preparo da solução),  $u_{\text{pi}}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

181

Figura 43. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do NOR por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Componentes da incerteza:  $u_{\text{curva}}$  (curva analítica),  $u_{\text{sol}}$  (preparo da solução),  $u_{\text{pi}}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

182

Figura 44. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do HIE por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7

- (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade). 182
- Figura 45. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do HLINE por MLC: C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade). 183
- Figura 46. Recuperações obtidas para o par de analitos (■) HOL/(□) HLOL. Linhas pontilhadas (----): limite inferior de 80% e limite superior de 120%. 187
- Figura 47. Recuperações obtidas para o par de analitos (□) HAE/(■) NOR. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%. 189
- Figura 48. Recuperações obtidas para o par de analitos (■) NOR/(□) HIE. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%. 191
- Figura 49. Recuperações obtidas para o par de analitos (□) HIE/(■) HLINE. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%. 191
- Figura 50. Eletroferogramas de uma mistura de padrões de  $\beta$ -carbolinas obtidas por meio das condições experimentais adaptadas do método de referência por MEKC. Todos os alcaloides foram detectados em  $\lambda = 241$  nm (A), exceto HLINE que foi detectado em  $\lambda = 383$  nm (B). HOL ( $2 \times 10^4$  ng g<sup>-1</sup>,  $t_m = 7,8$  min), NOR ( $1,7 \times 10^4$  ng g<sup>-1</sup>,  $t_m = 9,8$  min), HAE ( $9 \times 10^3$  ng g<sup>-1</sup>,  $t_m = 11,2$  min), HIE ( $2 \times 10^4$  ng g<sup>-1</sup>,  $t_m = 12,7$  min) e HLINE ( $2 \times 10^4$  ng g<sup>-1</sup>,  $t_m = 16,6$  min). 194
- Figura 51. Superposição de eletroferogramas de amostras de urina de voluntário não fumante: urina não fortificada (B) e urina fortificada (A) com uma mistura de padrões de HOL, NOR, HAE, HIE e HLINE. Todos os alcaloides foram detectados em  $\lambda = 241$  nm, exceto HLINE, em  $\lambda = 383$  nm. 196
- Figura 52. Superposição de cromatogramas de amostras de urina voluntário não fumante (A) e urina fortificada (B) com uma mistura de HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE. 197
- Figura 53: Cromatogramas superpostos de três amostras de urina de voluntários fumantes (A), (B) e (C) obtidos através das condições experimentais do método proposto por MLC. 201
- Figura 54. Superposição dos cromatogramas obtidos pela injeção da solução amostra de medicamento de fitoterápico Maracujá (A) e solução amostra de medicamento de fitoterápico Maracujá fortificado (B) com HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE. 203
- Figura 55. Cromatogramas obtidos pela injeção das amostras de urina de voluntário coletadas em tempos diferentes: antes da administração da dosagem do medicamento – 0 h (A), 1 h (B), 2 h (C) e 8 h (D) após a ingestão do fitoterápico. 204
- Figura 56. Superposição dos cromatogramas obtidos pela injeção, em condições experimentais por MLC de uma amostra de urina coletada após 8 h da ingestão de dois comprimidos do medicamento de fitoterápico Maracujá (A) e a mesma amostra de urina Maracujá (B) fortificada com HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE. 205

Figura 57. Superposição dos cromatogramas obtidos pela injeção, em condições experimentais por MLC de uma amostra de tintura de *P. incarnata* nas dosagens mínima de 20 gotas (A), máxima de 30 gotas (B) e amostra de 30 gotas fortificada (C) com HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE.

206

Figura 58. Superposição dos cromatogramas obtidos pela injeção, em condições experimentais por MLC de uma amostra de chá misto de maracujá contendo de *P. alata* Dryander em dois canais: 370/447 nm (A) e 370/495 nm (B) e a mesma amostra fortificada (C) com HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE.

207

Figura 59. Diagrama de distribuição (alfa das espécies) da galantamina em função do pH dos meios - aquoso (linha cheia) e micelar de SDS (linha pontilhada).

212

Figura 60. Cromatogramas advindos da injeção de solução de cada um dos padrões de OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v); volume de amostra 40  $\mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $30^\circ\text{C}$ . Os pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  para medição de fluorescência foram: OD 285/334 nm, NOx 285/332 nm, GAL 285/330 nm, ND 285/334 nm e EP 285/334 nm.

214

Figura 61. Cromatograma da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra 40  $\mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $30^\circ\text{C}$ ; medição de fluorescência em 285/330 nm.

215

Figura 62. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos em  $30^\circ\text{C}$  (A) e em  $25^\circ\text{C}$  (B). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra 40  $\mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; detecção em 285/330 nm.

216

Figura 63. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos com fases móveis contendo diferentes proporções de ACN: 7% (A), 9% (B), 12% (C) e 15% (D). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Et)<sub>3</sub>N (0,5%) e complemento de ACN. Volume de amostra de 40  $\mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; detecção em 285/330 nm.

217

Figura 64. Cromatogramas advindos da injeção de solução de cada um dos padrões de OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em (A) fase móvel tamponada em pH 5,0 (tampão acetato;  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e em (B) fase móvel tamponada em pH 8,0 (tampão

fosfato; 10 mmol L<sup>-1</sup>). Fase móvel micelar contendo SDS (50 mmol L<sup>-1</sup>), (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de 40 µL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/334 nm (OD), 285/320 nm (NOx), 285/330 nm (GAL), 285/334 nm (ND) e 285/334 nm (EP).

219

Figura 65. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), NOx (9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), GAL (4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), ND (9,6 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e EP (4,7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) usando: (A) fase móvel micelar com pH 3,0 (tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>) com 9% de ACN (B) fase móvel micelar com pH 5,0 (tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>) com 9% de ACN e (C) fase móvel micelar com pH 8,0 (tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>) com 12% de ACN. As fases móveis continham SDS (50 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%). Volume de amostra de 40 µL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

220

Figura 66. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), NOx (9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), GAL (4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), ND (9,6 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e EP (4,7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) variando a concentração de SDS e proporção de ACN na fase móvel: 40 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10% ACN (A) 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% ACN (B) e 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 15% ACN (C). Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5,0) contendo SDS e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (v/v). Volume de amostra de 40 µL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

223

Figura 67. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), NOx (9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), GAL (4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), ND (9,6 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e EP (4,7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) usando colunas cromatográficas com fase estacionária C18 com porosidade de A) 120 Å e B) 300 Å. Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5) contendo SDS (50 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de 40 µL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

225

Figura 68. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), NOx (9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), GAL (4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), ND (9,6 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e EP (4,7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) em função da concentração de SDS na fase móvel: 50 mmol L<sup>-1</sup> (A) e 25 mmol L<sup>-1</sup> (B). Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5,0) contendo SDS e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de 40 µL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

226

Figura 69. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), NOx (9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), GAL (4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), ND (9,6 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e EP (4,7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) em função da vazão da fase móvel: A) 1,0 mL min<sup>-1</sup> e B) 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5) contendo SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de injeção 40 µL; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

227

Figura 70. Cromatogramas da mistura contendo OD (4,5 x 10<sup>-5</sup> mol

L<sup>-1</sup>), NOx ( $9 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), GAL ( $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), ND ( $9,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e EP ( $4,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em função da porcentagem de ACN na fase móvel: 9% (A) e 5% (B), 3% (C), 2% (D) e 1% (E). Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5,0) contendo SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (v/v). Volume de injeção 40 µL; vazão de fase móvel de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura da coluna de 25 °C; detecção em 285/330 nm.

228

Figura 71. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), NOx ( $9 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), GAL ( $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), ND ( $9,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e EP ( $4,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) variando a porosidade da coluna cromatográfica. A) 120 Å. Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5) contendo SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9 v/v). Vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; B) 300 Å. Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5) contendo SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>) e (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (97/3 v/v). Vazão de fase móvel de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; Volume de amostra de 40 µL; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

229

Figura 72. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito NOx.

233

Figura 73. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito OD.

233

Figura 74. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito GAL.

234

Figura 75. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito ND.

234

Figura 76. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito NOx.

235

Figura 77. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do NOx por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

242

Figura 78. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do OD por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

242

Figura 79. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do GAL por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

243

Figura 80. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do ND por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

243

Figura 81. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do EP por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9



(C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

244

Figura 82. Recuperações obtidas para o par de analitos (■) GAL/(□) ND e (□) ND/(●) EP. Linhas pontilhadas (----): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

249

Figura 83. Superposição de cromatogramas obtidos pela introdução de amostra de urina voluntário (ensaio em branco) (A), de amostra de urina fortificada com os analitos (nível M2) (B) e de uma solução padrão dos analitos (C). As concentrações finais dos analitos nos cromatogramas B e C foram: NOx ( $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), OD ( $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), GAL ( $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ND ( $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e EP ( $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Volumes introduzidos de  $30 \mu\text{L}$  e condições experimentais indicadas na Tabela 37.

252

Figura 84. Cromatogramas obtidos pela introdução da solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): por HPLC de fase reversa em fase móvel composta por solução aquosa contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (1%) e ACN (20%) e pH 7 (A) com vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura da coluna de  $30^\circ\text{C}$ ; por MLC em fase móvel contendo tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0), SDS ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ )  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (97/3% v/v) (B) com vazão da fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ . Volume de amostra de  $20 \mu\text{L}$  e detecção em 290/320 nm por HPLC e 285/330 nm por MLC.

254

Figura 85. Curva analítica construída para GAL (A) em MLC e (B) em HPLC por fase reversa.

257

Figura 86. 1) Cromatogramas obtidos pela introdução da solução amostra de urina antes da administração do medicamento (A), solução amostra de urina coletada 2 h após a administração do medicamento (B) e solução amostra de urina coletada 2 h após administração do medicamento fortificada com os analitos (C). 2) Destaque dos cromatogramas A, B e C na região da GAL, ND e EP.

261

Figura 87. Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de uma solução de GAL ( $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) medidos em meio aquoso contendo tampão acetato (pH 5,0) e espectros de excitação (C) e emissão (D) de fluorescência de uma solução de GAL ( $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) medidos em meio aquoso contendo tampão acetato (pH 5,0) e  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS.

263

Figura 88. Cromatogramas obtidos com a introdução de solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (A) e o respectivo ensaio em branco (B) no experimento de adição de fase móvel micelar após a coluna cromatográfica. Fase móvel principal contendo tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (80/20% v/v) e mantida com vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  (bomba principal). Composição da solução micelar adicionada na mola de reação contendo tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) mantida com vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  (bomba secundária). Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

265

Figura 89. Linhas de bases obtidas com a mistura da fase móvel com a solução rica em micelas de SDS na ausência de propan-2-ol em ambas as soluções (A) e na presença de 2% de propan-2-ol em

ambas as soluções (B). Fase móvel consistindo de solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (80/20% v/v) e solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%). A relação da vazão das bombas principal/vazão de solução rica em micelas de SDS foi igual a 0,8/0,2  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

266

Figura 90. Linhas de bases obtidas com diferentes razões de vazão de fase móvel/vazão de solução rica em micelas de SDS de 0,8/0,2 (A), 0,8/0,5 (B), 0,5/0,5 (C) e 0,5/1,0 (D). Fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v). Solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) e propano-2-ol (2%). Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

267

Figura 91. Cromatograma obtido pela introdução de uma solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) usando fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, com solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) e propano-2-ol (2%). A razão entre a vazão da fase móvel e a vazão da solução rica em micelas foi igual 0,5/1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

268

Figura 92. Cromatograma obtido pela introdução de uma solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) usando fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, de (A) solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) e propano-2-ol (2%) e (B) solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0). A razão entre a vazão da fase móvel e a vazão da solução rica em micelas foi igual 0,5/1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

270

Figura 93. Curva analítica construída para GAL feitas com adição na mola de reação após a coluna cromatográfica de (A) de solução rica em micelas de SDS e (B) solução sem surfactante.

271

Figura 94. Gráfico de resíduos das curvas analíticas da GAL feitas com adição na mola de reação após a coluna cromatográfica de (A) de solução rica em micelas de SDS e (B) solução sem surfactante.

272

Figura 95. Cromatograma obtido pela introdução de amostra de riacho por HPLC usando a abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS na mola de reação após a coluna cromatográfica: (A) amostra fortificada com GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e (B) ensaio com branco de amostra. Fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, de solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) e propano-2-ol (2%) A razão entre a vazão da fase móvel e a vazão da solução rica em

micelas foi igual 0,5/1,0 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura da coluna de 25°C;  
volume de amostra de 40 µL; detecção em 285/330 nm. 274

## Lista de tabelas

Tabela 1: Siglas e nomenclaturas das $\beta$ -carbolinas	38
Tabela 2: Comparação entre as métodos para determinação das $\beta$ -carbolinas por HPLC e por MEKC	46
Tabela 3: Valores da literatura para $pK_a$ do equilíbrio cátion-neutro ( $pK_{CN}$ ) do estado fundamental.	50
Tabela 4: Valores de pH das soluções utilizadas na determinação do $pK_a$ aquoso por absorciometria.	139
Tabela 5: Valores de pH das soluções utilizadas na determinação do $pK_a$ em meio rico em micelas de SDS por absorciometria.	140
Tabela 6: Valores de comprimento de onda de absorvância para as espécies catiônicas dos alcaloides HAE, NOR e HIE ( $\lambda_{m\acute{a}x}^{(1)} BH^+$ ) e espécies neutras ( $\lambda_{m\acute{a}x}^{(2)} B$ ) nos meios aquosos sem e com SDS acima da CMC.	140
Tabela 7. Equações da reta, $R^2$ e valores de $pK_a$ para as $\beta$ -carbolinas HAE, HIE e NOR em meio aquoso sem SDS e em meio aquoso rico em micelas de SDS, determinados por absorciometria.	142
Tabela 8: Comprimentos de onda de excitação e de emissão máximos ( $\lambda_{exc/em}$ ) dos alcaloides HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE obtidos nas solução de composição escolhida para introdução no sistema cromatográfico.	145
Tabela 9. Rampa de comprimentos de onda de excitação e de emissão em função do tempo de corrida.	150
Tabela 10. Relação dos níveis codificados e reais para os fatores do planejamento fatorial composto central, CCD, $2^2$ .	158
Tabela 11. Descrição da composição das 11 fases móveis micelares em função da concentração de SDS e do valor de pH.	159
Tabela 12. Relação entre o número da fase móvel micelar, o tempo total de corrida e a eficiência de separação entre os seis alcaloides.	160
Tabela 13. Programação de detecção fluorimétrica das seis $\beta$ -carbolinas durante o processo de separação por MLC. Condições cromatográficas da Tabela 14.	164
Tabela 14: Condições do método de MLC para seis $\beta$ -carbolinas.	164
Tabela 15. Áreas dos picos cromatográficos correspondentes para cada $\beta$ -carbolina no período de estudo de estabilidade.	166
Tabela 16. Concentrações das soluções padrões de $\beta$ -carbolinas, em $ng\ g^{-1}$ , utilizadas na construção da curva analítica.	168
Tabela 17. Parâmetros analíticos de mérito obtidos para as $\beta$ -carbolinas em condições previamente otimizadas para a sua determinação por MLC.	174
Tabela 18. Incertezas combinada e expandida calculadas para as quatro fontes principais de incerteza associadas à medição da concentração das $\beta$ -carbolinas.	179
Tabela 19. Valores de concentração, em $ng\ g^{-1}$ , das $\beta$ -carbolinas utilizadas para a combinação das soluções para os testes de	

interferência.	184
Tabela 20. Relação da ordem de análise das misturas das $\beta$ -carbolinas e indicação de concentrações dos analitos na mistura e proporção entre as concentrações para os pares mais críticos de analitos.	186
Tabela 21. Condições experimentais adaptadas utilizadas no estudo comparativo com o método de referência baseado em MEKC para a quantificação das seis $\beta$ -carbolinas.	193
Tabela 22. Faixas de concentração das $\beta$ -carbolinas, em $\text{ng g}^{-1}$ , utilizadas na construção da curva analítica dos alcaloides no procedimento de determinação por MEKC.	194
Tabela 23. Equações da reta e valores de $R^2$ para as curvas analíticas construídas por MEKC para a série de $\beta$ -carbolinas.	194
Tabela 24. Valores de concentrações, em $\text{ng g}^{-1}$ , utilizadas na fortificação de amostras de urina de voluntário não fumante para o teste de recuperação por MLC e por MEKC e os fatores de diluição, entre parênteses.	196
Tabela 25. Teste t bi-caudal para os níveis de concentração C1 e C2 medidas por MLC e por MEKC.	198
Tabela 26. Valores resultantes da Análise de Variância – ANOVA: fator único, para a medida de concentração, em $\text{ng g}^{-1}$ , para o nível de concentração C1 por MLC e por MEKC.	198
Tabela 27. Valores resultantes da Análise de Variância – ANOVA: fator único, para a medida de concentração, em $\text{ng g}^{-1}$ , para o nível de concentração C2 por MLC e por MEKC.	199
Tabela 28. Valores de recuperação, em %, para os dois níveis de concentração C1 e C2, em $\text{ng g}^{-1}$ , obtidos pelo método proposto por MLC e pelo método de referência por MEKC em amostra de urina fortificada.	199
Tabela 29. Massa estimada, em ng, dos alcaloides presentes nas amostras de <i>Passiflora incarnata</i> em matrizes de medicamento fototerápico, tinturas, urina e <i>Passiflora alata</i> Dryander em matriz de chá.	209
Tabela 30: Comprimentos de onda de excitação e de emissão máximos ( $\lambda_{\text{exc/em}}$ ) dos analitos OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos nas soluções de composição escolhida <sup>1</sup> .	213
Tabela 31: Composição da fase móvel otimizada e parâmetros cromatográficos.	230
Tabela 32: Valores de massa (ng) utilizados na construção da curva analítica a partir da introdução de volumes entre 5 e 100 $\mu\text{L}$ de solução padrão <sup>1</sup> .	232
Tabela 33. Parâmetros de analíticos de mérito para as curvas analíticas da GAL e seus metabólitos principais – NOx, OD, GAL, ND e EP.	237
Tabela 34. Incertezas combinadas e expandidas calculadas para as quatro fontes principais de incerteza associadas à medição da concentração GAL e de seus metabólitos.	241
Tabela 35. Valores de massa introduzida no sistema cromatográfico (a partir de 40 $\mu\text{L}$ de solução) da GAL, ND e EP utilizadas para a	

combinação das soluções do teste de interferência.	246
Tabela 36. Relação da ordem de análise das misturas contendo GAL, ND e EP e indicação de massa dos analitos introduzida no sistema cromatográfico a partir de 40 $\mu$ L das misturas e proporção entre as massas introduzidas para os pares GAL:ND e ND:EP.	248
Tabela 37. Valores de massa introduzida de analito a partir da amostra de urina fortificada com soluções padrões de GAL e de seus metabólitos <sup>1</sup> .	252
Tabela 38. Valores de recuperação percentual dos analitos na amostra de urina fortificada com GAL e seus metabólitos.	253
Tabela 39. Condições experimentais utilizadas para a quantificação da GAL usando HPLC com detecção fluorimétrica.	254
Tabela 40. Valores de faixa de trabalho, em valores de massa introduzida de GAL, equações das curvas analíticas e valores de $R^2$ para o método proposto por MLC e para o método por HPLC.	257
Tabela 41. Teores de GAL obtidos pelo método proposto por MLC e pelo método por HPLC em amostra do medicamento contendo hidrobrometo de galantamina.	258
Tabela 42. Teste t bi-caudal presumindo variâncias equivalentes para os teores de GAL em medicamento contendo hidrobrometo de galantamina e determinados por MLC e por HPLC.	258
Tabela 43. Valores resultantes da Análise de Variância: fator único, para a medida de teor de GAL em medicamento contendo o hidrobrometo de galantamina por MLC e por HPLC.	259
Tabela 44. Condições experimentais para a determinação de GAL por HPLC de fase reversa usando abordagem com mistura de solução na mola de reação após a coluna cromatográfica.	269
Tabela 45. Parâmetros de mérito para as abordagens por HPLC com adição de solução após coluna cromatográfica.	273
Tabela 46. Valores de recuperação e seus respectivos desvios padrão para a GAL em água de riacho usando o método de HPLC com adição de solução rica em micelas de SDS na mola de reação após a coluna cromatográfica.	274

## Abreviaturas e Acrônimos

ACN	Acetonitrila
ALOD	Limite de detecção absoluto
ALOQ	Limite de quantificação absoluto
BGE	Eletrólito de corrida
CL	Quimioluminescência
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNPO	bis(2,4-dinitrofenil)oxalato
EP	Epigalantamina
EtOH	Etanol
(Et) <sub>3</sub> N	Trietilamina
FM	Fase móvel
FLD	Detector de fluorescência
GAL	Galantamina
HOL	Harmol
HLOL	Harmalol
HAE	Harmane
NOR	Norharmane
HIE	Harmine
HLIN	Harmaline
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
MeOH	Metanol
MLC	Cromatografia líquida micelar
ND	<i>N</i> -desmetilgalantamina
NOx	<i>N</i> -óxido galantamina
OD	<i>O</i> -desmetilgalantamina
P.	Passiflora
PAM	Parâmetros Analíticos de Mérito
RRLC	<i>Rapid Resolution Liquid Chromatography</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$u_c$	Incerteza combinada

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que se adapta  
melhor as mudanças.”  
(Charles Darwin)