#### 4.

# Desenvolvimento de método por cromatografia líquida micelar para quantificação de seis alcaloides β-carbolinas

#### 4.1

#### Resultados

#### 4.1.1

## Determinação dos valores de p $K_a$ (S<sub>0</sub>) das $\beta$ -carbolinas em meio aquoso e em meio aquoso organizado com o surfactante SDS

A constante de ionização (liberação de íons  $H^+$ ) da série de  $\beta$ -carbolinas no estado fundamental, o  $pK_a(S_0)$ , em solução aquosa foi determinada experimentalmente em diversos trabalhos e os dados resumidos na Tabela 3. Porém, não se encontrou dado algum na literatura científica indicando valores de  $pK_a(S_0)$  em meio aquoso contendo SDS acima da CMC (meio rico em micelas e tratado aqui como "meio micelar"). A presença de micelas pode influenciar o equilíbrio ácido-base das substâncias e, consequentemente, alterar o valor das constantes de ionização. Uma vez que o surfactante aniônico tende a estabilizar as espécies catiônicas por interações eletrostáticas é esperado um aumento do valor do  $pK_a$  das espécies em meio micelar de SDS (Gerakis et al., 1993; Ahmadi et al., 2007).

A fim de compreender o comportamento ácido-base das  $\beta$ -carbolinas em meio rico em micelas de SDS, determinou-se os valores de pK<sub>a</sub> dos alcaloides HAE, HIE e NOR, por espectrofotometria. Os valores de pK<sub>a</sub> encontrados são referentes ao pK<sub>CN</sub>, isto é, a constante de ionização dos alcaloides provenientes do equilíbrio entre as espécies catiônica e neutra.

A presença de micelas (carregadas negativamente) de SDS tendem a estabilizar a forma protonada (carregada positivamente) dos alcaloides, elevando o valor da constante ácida dessas substâncias. Todavia vale lembrar que para trabalhar com cromatografia líquida, o comportamento dos alcaloides e sua

espécie predominante devem ser compreendidos na faixa de pH de operação das colunas de separação, ou seja, entre 3 e 8 no caso da coluna com fase estacionária C18, pois esta é a faixa de pH viável para trabalhos com coluna de sílica convencional. Nesse contexto, a medida dos valores do pK<sub>a</sub> em meio micelar para HOL, HLINE e HLOL não se fez necessário, pois nessa faixa de pH de trabalho esses alcaloides estarão predominantemente na forma protonada, de acordo os respectivos valores de pK<sub>a</sub> (9,5; 9,5 e 11,3), em meio aquoso, descritos na literatura (Balón et al., 1993 b).

#### 4.1.2

### Determinação dos valores de pK<sub>a</sub> das β-carbolinas por absorciometria

A espectrofotometria de absorção molecular (absorciometria) é atrativa para se proceder a determinação de valores de  $pK_a$  por ser sensível e permitir se trabalhar, dependendo das moléculas-alvo do estudo, com soluções aquosas muito diluídas (da ordem de 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>). O fato de não se depender das alterações provocadas na interface solução-eletrodo também é vantajosos do ponto de vista da exatidão dos resultados em meio rico em micelas.

Tradicionalmente, na análise absorciométrica, a determinação dos valores de  $pK_a$  é realizada monitorando-se, num único comprimento de onda, as absorvâncias de seis a oito soluções de mesma concentração de um alcaloide preparado em meios com diferentes valores de pH (que pode ser ajustada com solução tampão). A partir de valores conhecidos das absortividades molares, o valor do  $pK_a$  é determinado pelo ajuste de fórmulas estabelecidas pelos conjuntos de dados experimentais. Vale salientar que a posição espectral da espécie protonada e da desprotonada devem apresentar alguma diferença e as respectivas absortividades molares devem ser determinadas pela inclinação de uma curva analítica em situação de pH que garanta a presença predominante de uma das espécies (Tam e Takács-Novák, 2001).

Neste trabalho, para cada um dos três alcaloides estudados, foram preparadas oito soluções aquosas e oito soluções aquosas no meio rico em micelas de SDS. Cada uma das oito soluções teve o pH ajustado para valor específico e distinto e que foram escolhidos com base nos valores da literatura (Thomas-Vert et al., 1983; Balón et al., 1993 b). A fim de garantir a presença apenas da espécie catiônica, a primeira solução de cada um dos alcaloides foi acidificada com solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> até atingir um valor de pH abaixo de 2. No extremo oposto, a fim de obter um espectro predominante da forma neutra na oitava solução, o pH do meio foi ajustado para valores acima de 12, pela adição de uma solução de NaOH a 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Os valores de pH das soluções numeradas de 2 a 7 foram ajustados com solução tampão fosfato (hidrogenofosfato de sódio/ácido fosfórico). Na Tabela 4 e na Tabela 5 são mostradas, respectivamente, os valores de pH das soluções aquosas na ausência e na presença de micelas de SDS que foram utilizadas na determinação dos valores de pK<sub>a</sub>.

Para a determinação dos valores de  $pK_a$  foram utilizados meios de elevada força iônica a fim de minimizar a diferença entre a concentração total dos íons H<sup>+</sup> e a atividade dos íons H<sup>+</sup> em solução. Com isso, foi possível obter o valor do pH em termos de concentração de H<sup>+</sup>. Para manter a força iônica ajustada e constante foi adicionada solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaCl em todas as oitos soluções.

0.1.~		Valores de pH	
Soluções	HAE	NOR	HIE
1	< 2	< 2	< 2
2	7,1	6,0	7,1
3	7,5	6,2	7,4
4	7,7	6,5	7,6
5	7,9	7,2	8,0
6	8,4	7,9	8,3
7	8,8	8,8	9,1
8	> 12	> 12	> 12

Tabela 4. Valores de pH das soluções utilizadas na determinação do  $pK_{\rm a}$  aquoso por absorciometria.

0.1.~			
Soluções	HAE	NOR	HIE
1	< 2	< 2	< 2
2	7,2	8,0	7,1
3	7,5	8,5	7,4
4	7,8	9,1	7,6
5	8,4		8,0
6	8,8	10,0	8,9
7	9,5	10,6	10,3
8	> 12	> 12	>12

Tabela 5. Valores de pH das soluções utilizadas na determinação do  $pK_a$  em meio rico em micelas de SDS por absorciometria.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores dos comprimentos de onda máximos de absorção dos alcaloides (em nm), considerando as espécies catiônicas  $(\lambda_{máx (1)} BH^{+})$  e espécies neutras  $(\lambda_{máx (2)} B)$  nos meios aquosos sem e com SDS (acima da CMC).

Tabela 6: Valores de comprimento de onda de absorvância para as espécies catiônicas dos alcaloides HAE, NOR e HIE ( $\lambda_{máx (1)} BH^+$ ) e espécies neutras ( $\lambda_{máx (2)} B$ ) nos meios aquosos sem e com SDS acima da CMC.

Substância	Meio	sem SDS	Meio com SDS		
	$\begin{array}{c} \lambda_{m\acute{a}x(1)}(BH^{\scriptscriptstyle +})\\(nm) \end{array}$	$\lambda_{máx(2)}(B)(nm)$		$\lambda_{\max(1)} (BH^+)$ (nm)	$\lambda_{máx(2)}(B)(nm)$
HAE	288	299		289	302
NOR	288	302		290	304
HIE	299	317		303	327

Os comprimentos de onda para o HIE e HAE estão de acordo com os valores apresentados na literatura tanto em meio aquoso sem surfactante (Thomas-Vert et al., 1983; Balón et al., 1993 b) quanto em meio rico em micelas de SDS (Martín, 2005).

As Figuras a seguir (Figura 19, Figura 20 e Figura 21) mostram os espectros de absorção para os alcaloides em meio aquoso sem surfactante (A) e em meio rico em micelas de SDS (B) em diferentes valores de pH.



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).



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).



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).

Pode ser observado nas figuras com os espectros que em todos o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{máx}$ ) se desloca em função do pH do meio aquoso. Em meios ácidos, os  $\lambda_{máx}$  dos alcaloides sofreram deslocamentos batocrômicos, enquanto que em meios básicos, o deslocamento ocorreu para comprimentos de onda menores, caracterizando deslocamento hipsocrômico.

Os valores de  $pK_a$  das substâncias em  $S_0$  puderam ser determinados através da mudança do espectro de absorvância das soluções de diferentes pH e pela equação de Jaffé e Orchin (1962) (Equação 63), onde A é a absorvância da substância nas soluções,  $A_{BH+}$  é a absorvância da espécie química na forma

catiônica presente em solução de pH ácido mais extremo e  $A_B$  é a absorvância da espécie química na forma neutra em solução de pH básico mais extremo. Os valores das absorvâncias A,  $A_{BH+}$  e  $A_B$  foram medidos nos comprimentos de onda máximos de cada espectro.

$$pK_a(S_0) = pH - \log\left(\frac{A_{BH^+} - A}{A - A_B}\right)$$
(63)

Assim, a partir dos dados experimentais aplicados à Equação 63 e tomando a mesma como uma equação da reta, do valor do coeficiente linear foi extraído o valor de  $pK_a$ . Na Tabela 7 são apresentadas as equações da reta, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e os valores de  $pK_a$ , em meio aquoso sem surfactante e em meio organizado por micelas de SDS, para cada um dos alcaloides.

As equações da reta obtidas para os alcaloides, em meio aquoso sem SDS, apresentaram valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,97, indicando um bom ajuste ao modelo linear. Em meio contendo micelas de SDS, as equações da reta e valores de  $R^2$  obtidos para HAE, NOR e HIE também se ajustaram no modelo linear.

Tabela 7. Equações da reta,  $R^2$  e valores de pK<sub>a</sub> 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.

	Meio aquoso	o sem SDS		Meio aquoso rico em micelas de SDS			
Substância	Equação – meio aquoso sem SDS	$\mathbf{R}^2$	pK <sub>a</sub>	Equação – meio aquoso rico em micelas de SDS	$\mathbb{R}^2$	pK <sub>AM</sub>	
HAE	y = 0,79 x + 7,47	0,98	7,5	y = 0,78 x + 8,39	0,99	8,4	
NOR	y = 1,13 x + 7,11	0,99	7,1	y = 1,26 x + 7,97	0,97	8,0	
HIE	y = 0,97 x + 7,71	0,97	7,7	y = 1,23 x + 8,65	0,97	8,6	

Como mencionado, no modelo usado, o coeficiente linear da equação da reta representa o valor de  $pK_a$  da substância. Observa-se a tendência do aumento do valor de  $pK_a$  no "meio micelar" ( $pK_{am}$ ) em torno de uma unidade em relação ao  $pK_a$  no meio aquoso sem surfactante para os alcaloides HAE, NOR e HIE. O aumento do valor de  $pK_{am}$  confirmou a estabilização da espécie catiônica das  $\beta$ -

carbolinas pela interação com a superfície da micela de SDS carregada negativamente. Seguindo a mesma tendência do aumento do valor da constante de ionização em meio rico em micelas, os valores de  $pK_{am}$  das substâncias HOL, HLOL e HLINE provavelmente resultariam em valores entre 10,5 a 12,5.

#### 4.1.3

## Desenvolvimento de método de separação das seis β-carbolinas por MLC

O desenvolvimento de método para a separação de  $\beta$ -carbolinas utilizando MLC com detecção fluorimétrica requer o conhecimento prévio da influência de três principais parâmetros cromatográficos: (i) natureza e concentração do surfactante, (ii) natureza e concentração do modificador orgânico e (iii) o pH do meio. Características físico-químicas como as informações obtidas sobre o comportamento ácido-base dos analitos serviram de premissas para a escolha das condições experimentais.

As β-carbolinas possuem características ácido-base particulares devido à presença do nitrogênio do pirrol (caráter ácido) e o nitrogênio do anel piridina (caráter básico), como já discutido. Essas substâncias apresentam-se predominantemente nas formas: (i) catiônica, em pH ácido abaixo de 5 e (ii) neutra, em valores elevados de pH acima de 12. Em função disso, foi escolhido o dodecilsulfato de sódio (SDS), surfactante aniônico, para compor a fase móvel micelar de forma a promover interação com os alcaloides. Se os alcaloides estiverem predominantemente na forma catiônica, as micelas de SDS tenderão a interagir eletrostaticamente com os alcaloides pela sua superfície, que é carregada negativamente. Por outro lado, se a predominância for da espécie neutra, as micelas de SDS poderão se ligar aos analitos pela sua superfície por meio da indução eletrostática. As β-carbolinas também podem apresentar-se como espécies aniônicas, quando em meio com concentrações elevadas de base forte, acima de 6 mol  $L^{-1}$ . Essa condição é indesejável, pois ocorrerá repulsão eletrostática entre a micela aniônica de SDS. Ademais, concentrações muito elevadas de base forte são inadequadas para estudos em sistema de HPLC.

## Estudos preliminares das condições de separação cromatográfica por MLC

Inicialmente, a separação das β-carbolinas em meio rico em micelas de SDS foi realizada em pH ácido e igual a 3, onde a espécie catiônica é predominante. Nessas condições, há uma maior possibilidade de interação eletrostática entre o surfactante aniônico e as  $\beta$ -carbolinas. Para isso, a fase móvel micelar foi preparada em um tampão 10 mmol  $L^{-1}$  de acetato de sódio e o valor do pH foi ajustado com ácido acético. Vale destacar que valores de pH abaixo de 3 e acima de 8 não são recomendados para o uso em colunas cromatográficas C18 de fase reversa. Para a modificação da coluna é recomendável a utilização de concentrações do surfactante acima da CMC (em torno de 8 mmol L<sup>-1</sup>). No entanto, os testes preliminares foram realizados em fase móvel micelar contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS para garantir meio rico em micelas em regime de vazão de fase móvel. Além disso, ACN foi usado como modificador orgânico, baseado no trabalho de López-Grío et al. (2001) no qual os autores avaliaram a eficiência de separação de treze fármacos utilizando diferentes modificadores orgânicos (ACN, butanol, tetrahidrofurano, 1-propanol e 1-pentanol) por MLC com surfactante SDS. O ACN foi o solvente que permitiu uma separação, na linha de base, dos fármacos em uma faixa mais robusta de concentração de SDS e de porcentagem deste solvente na fase móvel, além de aumentar a eficiência e a simetria dos picos. A literatura também indica que adição de pequena quantidade do reagente trietilamina  $(N(C_2H_5)_3)$ ,  $(Et)_3N$ , tende a melhorar do perfil dos picos cromatográficos de compostos básicos, diminuindo o efeito cauda em função da sua interação com os grupos silanóis que ficam sem interagir com o surfactante (Cline-Love e Fett, 1991; Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000). A vazão da fase móvel, de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, e a temperatura da coluna, de 25°C, foram escolhidos inicialmente por serem valores usados frequentemente em separações cromatográficas.

Na Figura 22 são mostrados os cromatogramas obtidos para cada uma das seis  $\beta$ -carbolinas (em concentração de 1 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>) nas condições iniciais escolhidas, ou seja, fase móvel composta por solução tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0) contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 5%, em volume, de

ACN; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 25°C. O volume de 20  $\mu$ L de solução de analito (preparado em fase móvel micelar de mesma composição) foi o escolhido para ser introduzido no sistema cromatográfico. Avaliando o comportamento obtido, com a introdução de soluções padrões puras para cada analito, a ordem de tempos de retenção foi: HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE.

Por meio dos espectros de fluorescência em três dimensões foram definidos os comprimentos de onda de excitação e de emissão máximos ( $\lambda_{exc/em}$ ) dos seis alcaloides (Tabela 8).

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.

	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE
λ <sub>excitação</sub> (nm)	334	378	370	310/374	342	382
λ <sub>emissão</sub> (nm)	419	479	435	447	416	467

Vale ressaltar que nos cromatogramas, a fluorescência medida foi em unidades de luminescência e denominadas simplesmente de "sinal". Na Figura 22 a intensidade de fluorescência foi normalizada de tal forma que tivessem a mesma intensidade, permitindo que se observasse claramente a posição de cada pico (sozinho em solução) no seu respectivo cromatograma.

Analisando os cromatogramas, observa-se que o HOL é a primeira substância a ser eluida com tempo de retenção ( $t_R$ ) em torno de 7 min enquanto o HLINE foi o último alcaloide a ser eluido, próximo a 20 min. Os pares de picos correspondentes a HOL/HLOL e HIE/NOR provavelmente co-eluiriam parcialmente em misturas cromatografadas nas condições iniciais em função da proximidade dos valores de  $t_R$  (7 e 7,5 min) e (17 e 18 min) respectivamente para os pares citados. Assim, esforços foram direcionados para melhorar a eficiência de separação visando também o menor tempo de corrida cromatográfica.



Figura 22. Injeções individuais de HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE de concentração 2,5 x  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Composição da fase móvel micelar: tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5%, em volume, (Et)<sub>3</sub>N/ACN(95/5 v/v). Volume de amostra introduzida de 20 µL e vazão igual a 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna a 25°C. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  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.

#### 4.1.5

## Estudos da variação da vazão de fase móvel e estabelecimento do programa de detecção em função dos tempos de retenção

A fim de aumentar a eficiência de separação entre os pares de analitos HOL/HLOL e HIE/NOR, foi realizada a redução da vazão de fase móvel para 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Na Figura 23 são mostrados os cromatogramas obtidos pela injeção de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas variando a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (A) para 0,6 mL min<sup>-1</sup> (B). A composição da fase móvel micelar e a temperatura foram aquelas estabelecidas para o cromatograma preliminar. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  para detecção dos alcaloides foram: HOL 356/410, HLOL: 356/500, HAE: 370/435, NOR: 370/447, HIE: 370/416 e HLINE: 370/495 nm.



Figura 23. Cromatogramas da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas, HOL, HLOL, HAE, HIE, NOR e HLINE de concentração 2,5 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, variando a vazão de fase móvel: 1,0 mL min<sup>-1</sup> (A) e 0,6 mL min<sup>-1</sup> (B). Composição da fase micelar: tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 5%, em volume, de ACN. Temperatura da coluna de 25°C e volume de amostra introduzida de 20 µL. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  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.

Embora tenha sido observado o aumento no tempo total de corrida de 22 min (cromatograma A) para 31 min (cromatograma B), a separação de picos obtida no cromatograma B melhorou sensivelmente. A variação da vazão da fase móvel aumentou o tempo de interação entre micela-analito-fase estacionária modificada (M-A-FEM) melhorando assim a separação das zonas dos respectivos analitos. Contudo, como esperado, o tempo de corrida aumentou e os picos ficaram ligeiramente mais largos. Apesar disso, a vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> foi escolhido para dar continuidade ao desenvolvimento do método.

Uma funcionalidade do cromatógrafo utilizado nesse trabalho é a possibilidade do estabelecimento de um programa de detecção com a variação dos comprimentos de onda de excitação e de emissão em função do tempo de retenção dos analitos. O equipamento também permite a detecção de fluorescência em quatro canais diferentes, denominados A, B, C e D. Assim, para cada intervalo de tempo de corrida foi possível utilizar quatro pares de  $\lambda_{exc/em}$ .

A vantagem de se estabelecer a programação de detecção é que as substâncias, presentes em uma mistura, poderão ser detectadas em seus pares  $\lambda_{exc/em}$  máximos ou próximos dele, promovendo assim a maximização de sinal analítico e consequentemente melhoria na sensibilidade e capacidade de detecção. Outra vantagem é poder realizar as medições de sinal em  $\lambda_{exc/em}$  específicos do analito, o que pode acarretar em maior seletividade do método. Por exemplo, para pares de picos com menor resolução, detectados em canais diferentes, os efeitos de interferência de co-eluição podem ser minimizados, como pode ser observado no par HOL/HLOL na Figura 24.

Com base nos resultados obtidos nos cromatogramas da Figura 24, foi programada a variação do par  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  em função do tempo de corrida de modo a se ter o par ideal dentro da faixa que contém o tempo retenção de cada um dos alcaloides. O HOL tem o máximo de sua fluorescência no par de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  de 334/419 nm enquanto que para o HLOL esse máximo ocorre em 378/479 nm (Tabela 8). Então, para as injeções dos analitos HOL e HLOL foi fixado o  $\lambda_{exc}$  em 356 nm (que é o compromisso entre 334 e 378 nm do HOL e HLOL respectivamente) e o  $\lambda_{em}$  foi definido como o  $\lambda_{máximo}$  de cada um dos respectivos analitos, cuja detecção foi realizada em canais diferentes. Aos dois canais restantes, foram atribuídos valores de  $\lambda_{em}$  nos quais, sem grandes decréscimos na intensidade do sinal, existe a possibilidade de se medir os sinais do HOL ou do HLOL, com a menor interferência possível de um sobre o outro. Dessa forma, foram atribuídos para os canais C e D valores mais extremos de  $\lambda_{em}$  para HOL (410 nm) e HLOL (500 nm).

Na Figura 24 é mostrado o cromatograma de uma mistura dos seis alcaloides com medição de sinal nos quatro canais de detecção de fluorescência, com a região do HOL/HLOL em destaque na figura. Os analitos HOL e HLOL eluiram com valores de t<sub>R</sub> aproximadamente de 13 min (HOL) e 14,2 min (HLOL). Pode ser observado no cromatograma da mistura dos alcaloides do canal C, que foi possível obter a medição do sinal do HOL e um pequeno ombro no tempo de retenção do HLOL. No canal D, observou-se pequeno sinal atribuído ao HOL e um sinal maior atribuído ao HLOL, mostrando uma minimização da interferência do HOL na quantificação do HLOL pela seleção de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ .



Figura 24. (a) Cromatograma da injeção de uma mistura dos seis alcaloides de concentrações iguais a 1 x  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> para HOL e HLOL e demais analitos iguais a 1 x  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. (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 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 5%, em volume, de ACN. Volume de amostra introduzida de 20 µL, vazão igual a 0,6 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna a 25°C.

Como os analitos HAE, HIE e NOR possuem  $\lambda_{em}$  iguais a 435, 416 e 447 nm, respectivamente, não foi possível utilizar o mesmo recurso de discriminação usado para o par HOL/HLOL. Como os alcaloides eluiram em tempos próximos e possuem comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão similares, o  $\lambda_{exc}$  foi fixado em 360 nm (valor de compromisso para os  $\lambda_{exc}$  entre os quatro alcaloides HAE, HIE, NOR e HLINE) e os valores de  $\lambda_{em}$  de cada substância foi atribuída a um canal diferente de tal forma que cada  $\beta$ -carbolina seria detectada em um par de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  mais próximo possível do seu máximo de fluorescência.

Desta forma, os analitos na ordem de eluição foram detectados nos seguintes canais e pares de comprimentos de onda de excitação e de emissão: (i) HOL 356/410 nm (canal C), (ii) HLOL 356/500 nm (canal D), (iii) HAE 370/435 nm (canal A), (iv) HIE 370/416 nm (canal D), (v) NOR 370/447 nm (canal B) e (vi) HLINE 370/495 nm (canal C). Como as  $\beta$ -carbolinas possuem pares de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  próximos, é possível que em um mesmo canal os seis alcaloides sejam monitorados, porém, a quantificação da área do pico foi realizada no canal correspondente a cada substância. Vale salientar que no decorrer do ajuste dos parâmetros cromatográficos, para todas as injeções das misturas das seis  $\beta$ -carbolinas, a programação dos pares de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  permaneceram os mesmos.

Todavia, dependendo das condições dos experimentos, os tempos de retenção dos analitos sofreram alterações, sendo então necessário ajustar a faixa de tempo na programação de comprimento de onda. Na Tabela 9 é apresentado o programa de detecção dos seis alcalóides durante a corrida cromatográfica (indicando  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$ ). Os intervalos de tempo foram baseados nos cromatogramas apresentado na Figura 24.

Tabela 9. Rampa de comprimentos de onda de excitação e de emissão em função do tempo de corrida.

β-carbolina	Faixa de tempo (min)	•	$\lambda_{ m em}$				
		λ <sub>exc</sub> (nm)	(nm)				
			Canal A	Canal B	Canal C	Canal D	
HOL/HLOL	0,0 – 17,0	356	479	419	410	500	
HAE/HIE/NOR/ HLINE	18,0-32,0	370	435	447	495	416	

Somente serão apresentados os picos cromatográficos relativos às  $\beta$ carbolinas, obtidas no canal A, para facilitar a visualização dos cromatogramas da mistura de alcaloides.

#### 4.1.6

#### Estudo da influência da concentração de surfactante

A concentração de SDS na fase móvel foi avaliada em três concentrações distintas, 70, 150 e 200 mmol L<sup>-1</sup>, todas acima da CMC, mantendo-se todas as outras condições experimentais iguais às usadas para se obter o cromatograma da Figura 23 B. Na Figura 25 são mostrados os cromatogramas obtidos injeções de soluções padrão variando apenas a concentração de SDS (mantendo a mesma proporção tanto na fase móvel micelar quanto na solução dos analitos injetada no sistema).

De acordo com os resultados, a variação da concentração do surfactante alterou a resolução dos picos e provocou uma diminuição no tempo total de corrida, que caiu de 46 para 20 min considerando a eluição do analito mais retido e vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Não foram realizados testes com fases móveis contendo

concentrações de SDS acima de 200 mmol L<sup>-1</sup> devido à dificuldade na sua solubilização do surfactante na fase móvel, gasto do reagente e saturação no sistema cromatógrafo líquido.



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

Como todas as seis  $\beta$ -carbolinas presentes na mistura introduzida no sistema cromatográfico tiveram seus tempos de retenção reduzidos em função do aumento da concentração de SDS, pode-se afirmar que os seis alcaloides possuem comportamento *binding*, isto é, interagem mais efetivamente com as micelas de SDS na fase móvel do que com a fase estacionária modificada. O aumento da cocentração de SDS não provoca alteração proporcional na fase estácionária já modificada, quando da adição de menores quantidades de surfactante. Por outro lado, a quantidade de micelas livres na fase móvel aumenta proporcionalmente com o acréscimo de SDS, o que acarreta um desequilíbrio da interação micela-analito-fase móvel modificada. O aumento da concentração das micelas na fase móvel favorece uma maior interação analito-micela, diminuindo a interação analito-fase móvel modificada. Assim, o tempo de retenção dos alcaloides analisados diminui, já que as micelas percolam pela coluna na fase móvel carreando os analitos.

Em relação à separação dos picos, com o aumento da concentração de SDS de 70 (cromatograma A) para 150 mmol  $L^{-1}$  (cromatograma B) foi possível observar nitidamente uma melhora na separação dos picos cromatográficos do HOL/HLOL e dos picos correspondentes aos analitos HIE/NOR. A fase móvel contendo 200 mmol  $L^{-1}$  de SDS (cromatograma C) apresentou comportamento de separação similar ao do cromatograma A, no qual os alcaloides HOL/HLOL e HIE/NOR tenderam a co-eluir. Das condições testadas, o melhor perfil de separação dos alcaloides foi obtido com a fase móvel micelar contendo 150 mmol  $L^{-1}$  de SDS. Portanto, nos experimentos posteriores essa concentração de SDS foi mantida.

#### 4.1.7

### Estudo da variação da natureza e da porcentagem do solvente orgânico na fase móvel micelar

A presença de solvente orgânico, como modificador químico, na fase micelar tem papel relevante nas separações por MLC. A natureza do solvente orgânico a ser utilizado foi avaliada de tal forma que se escolheu três diferentes modificadores, com base nos trabalhos acadêmicos com MLC: ACN (López-Grío et al., 2001), que já foi incorporado nas condições preliminares na proporção, em volume, de 5%, metanol e propan-2-ol (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000; Ruiz-Ángel et al., 2009). Para tal, solução padrão da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas foi introduzida no sistema nas condições estabelecidas até o momento, variandose apenas a natureza do solvente orgânico adicionado na proporção de 5%. Nessas condições, o perfil cromatográfico das  $\beta$ -carbolinas se manteve o mesmo, independentemente do modificador químico, não ocorrendo nenhuma alteração significativa na resolução dos picos, nos tempos de retenção das substâncias e no tempo total de corrida cromatográfica. Dessa forma, decidiu-se pelo uso do ACN para a continuidade dos experimentos. No entanto, um último teste foi realizado de modo a se verificar o efeito provocado pela proporção de ACN na fase móvel na separação cromatográfica.

Para tal, dois níveis de proporção de ACN foram usados, sendo um baixo (5%), porém considerando eficiente para MLC, e um elevado (20%),

152

considerando o máximo para solventes orgânicos em MLC. Valores mais elevados não foram testados, pois isso provocaria alterações nas condições de formação das micelas. Na Figura 26 são mostrados os cromatogramas resultantes do processo de separação da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas em fases móveis micelares contendo proporções de 20% (A) e 5% (B) de ACN, em volume.



Figura 26. Cromatogramas da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração 1 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> comparando duas proporções de ACN: 20% (A) e 5% (B). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e ACN. Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 25°C e volume de injeção de 20 µL em todas as injeções. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

A elevação da porcentagem de ACN na fase móvel micelar provocou leve aumento nos tempos de retenção de todas as seis  $\beta$ -carbolinas, principalmente da HAE/ HIE/NOR/HLINE. Além disso, ocorreu uma piora na resolução entre os analitos HOL/HLOL (Figura 26 A). Com o aumento da proporção de ACN houve um aumento no tempo total de corrida cromatográfica, medida pelo tempo de retenção do analito mais retido (HLINE), que variou de 31 min para 34 min. Esse comportamento de alteração na retenção de todos os alcaloides confirma o caráter *binding*, ou seja, a proporção mais elevada de ACN provoca a redução da quantidade de micelas na fase móvel, diminuindo a influência de interação micela-analito em relação à interação analito-fase estacionária, já que a maior porcentagem de solvente orgânico pode prejudicar a estabilidade da fase estacionária modificada e a integridade das micelas (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000). O uso de menor proporção de ACN repercute no menor custo e na redução de resíduos tóxicos gerados pelas análises cromatográficas. Assim, de acordo com os resultados discutidos, a adição de ACN na proporção, em volume, de 5% foi escolhida para o método.

### 4.1.8 Estudo preliminar do valor de pH da fase móvel micelar

Como discutido, com o intuito de manter as  $\beta$ -carbolinas carregadas positivamente em solução (de modo a promover melhor interação com as micelas de SDS), o valor do pH do meio foi mantido em 3,0. Nessa etapa, um ajuste de pH foi realizado de tal forma a se compreender a tendência desse efeito na separação cromatográfica dos alcaloides. Os testes comparativos foram realizados em pH 3,0 e em pH 5,0, este último ainda pH ácido, onde ainda há a predominância das espécies catiônicas dos alcaloides em meio micelar (Martín et al., 2005).

A superposição dos cromatogramas (intensidade de sinal normalizada) resultantes da introdução de soluções padrões de cada uma das seis  $\beta$ -carbolinas usando fase móvel micelar ajustada com pH 5,0 (Figura 27) indicaram melhora significativa na resolução dos pares críticos HOL/HLOL e HAE/NOR. É interessante notar que também foi observada uma inversão na ordem de retenção do HIE com NOR, resultando numa nova ordem de eluição das  $\beta$ -carbolinas: HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE. A NOR é a  $\beta$ -carbolina que é mais influenciada em relação à interação entre micela-analito-fase estacionária modificada em função do pH. Isso se justifica pela diferença da estrutura química da NOR em relação aos demais, a qual não possui nenhum substitutinte nos anéis pirrolíco, piridínico e aromático.



Figura 27. Cromatogramas obtidos para cada uma das seis  $\beta$ -carbolinas, na concentração de 2,5 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Composição da fase móvel micelar: tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 5% de ACN em volume. Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 25°C e volume de injeção 20 µL. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  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.

A melhoria na separação obtida com a fase micelar móvel em pH 5,0 é melhor visualizado quando comparado com o resultado obtido em pH 3,0, indicado na Figura 28, em que são apresentados os cromatogramas obtidos a partir de solução contendo a mistura de todas a seis  $\beta$ -carbolinas, na concentração 2,5 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. A comparação dos cromatogramas indica a melhoria significativa na resolução entre os pares de pico HOL/HLOL e HAE/HIE/NOR.



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

### 4.1.9 Ajuste da temperatura da coluna cromatográfica

Muito embora tenha se verificado a melhoria na resolução dos picos, a separação plena entre HOL/HLOL e a separação entre o par HAE/NOR não foi atingida em pH 5,0. Assim, decidiu-se avaliar se um simples ajuste na temperatura de separação poderia beneficiar o processo de separação. Na Figura 29 é apresentada a superposição dos cromatogramas obtidos da injeção de uma mistura dos padrões das  $\beta$ -carbolinas, com a região dos analitos HAE/NOR em destaque, em diferentes temperaturas, em °C: A) 40, B) 30 e C) 25. Com base nos cromatogramas, a temperatura de 25°C foi a condição de análise que apresentou a melhor resolução, próximo à linha de base.



Figura 29. Superposição de cromatogramas obtidos da mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> (a) e a região aumentada (b) do HAE/NOR variando a temperatura da coluna, °C: 40 (A), 30 (B) e 25 (C). Composição da fase móvel micelar: tampão acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 5,0), contendo 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 5% de ACN, em volume. Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção 20 µL. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/419, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/447 nm.

#### 4.1.10

## Estudo multivariado para ajuste final da concentração de SDS e do valor de pH da fase móvel micelar

A condição cromatográfica estabelecida até aqui evoluiu a partir de um primeiro ajuste experimental baseado em alguns experimentos univariados, ou simplemente comparações pontuais baseadas nas condições típicas para MLC ou HPLC, e que envolveu a avaliação da concentração do SDS, a escolha da natureza e da percentual de modificador orgânico, a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna. Porém, a partir dos resultados obtidos, concluiu-se que ainda haveria espaço para melhorias, principalemente em termos da resolução entre HOL e HLOL e entre HAE, HIE e NOR. Assim, decidiu-se por realizar um ajuste fino de condições por meio de um planejamento de experimental (otimização multivariada) envolvendo dois dos principais parâmetros que afetariam a retenção diferenciada entre  $\beta$ -carbolinas, ou seja, a concentração de SDS e o valor do pH da fase móvel micelar. Esse tipo de otimização multivariada permite a verificação da existência de interações sinérgicas ou antagônicas entre os parâmetros estudados o que pode refletir na escolha das condições que permitam a separação plena dos picos e no tempo total de corrida cromatográfica.

O pH da fase móvel, em particular, é um parâmetro relevante na separação cromatográfica de espécies que possuem caráter ácido-base em solução, assim o ajuste final do seu valor na fase móvel micelar foi realizado no planejamento que incluiu também o estudo da concentração de SDS, já que esses são dois fatores que tem grande chance de se influenciarem mutualmente. Com relação ao pH, vale ressaltar também, que em alguns trabalhos acadêmicos para a quantificação das  $\beta$ -carbolinas por HPLC foram utilizados fases móveis com pH próximo de 8 (Moncrieff, 1989; Yritia et al., 2002; Kartal et al., 2003 e González-Ruiz et al., 2011).

A proporção de ACN na fase móvel não foi incluída já que se pretende trabalhar com valores mínimos desse solvente, no caso proporção de 5%, perto do mínimo recomendado para MLC que é de 3% (Dorsey et al., 1983). Adicionalmente, excluiu-se tal parâmetro do planejamento com base no pequeno efeito causado por uma variação grande de ACN na fase móvel, indicando a limitação de tal ajuste. A vazão da fase móvel de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna de 25°C foram considerados adequados frente ao que foi observado nos estudos preliminares, de tal forma que caso fosse necessário um ajuste, isso poderia ser feito posteriormente com um estudo univariado.

Ajustados separadamente, verificou-se que o aumento tanto do valor do pH da fase estacionária quanto da concentração de SDS tende a provocar uma melhora a resolução entre os picos dos alcaloides. Assim sendo, foi realizado o planejamento multivariado fatorial do tipo composto central (CCD  $2^2$ ) da fase

móvel micelar com essas duas variáveis estabelecendo os níveis indicados na Tabela 10, onde se mostra os níveis codificados: -1 (valor inferior para o parâmetro), 0 (valor intermediário para o parâmetro) e +1 (valor superior para o parâmetro), sendo os níveis adicionais (valores extremos) de  $-\sqrt{2}$  e  $+\sqrt{2}$ produzidos na rotação característica do planejamento.

Os limites estabelecidos para o valor do pH da fase móvel micelar se baseou na melhoria alcançada na resolução dos picos quando se ajustou o valor desse parâmetro de 3,0 para 5,0. Assim, de modo a garantir que o valor 5,0 estivesse incluso na faixa de trabalho do planejamento como -1, o valor mínimo de 4,5 ( $-\sqrt{2}$ ) foi adotado para o pH. Já o limite superior ( $+\sqrt{2}$ ) de pH da fase móvel no planejamento foi 8,0, onde se tem um limite seguro de operação para a fase estacionária, coincidindo com os valores estabelecidos na literatura para a separação de  $\beta$ -carbolinas por HPLC. Com o intuito de não saturar o sistema cromatográfico e evitar o gasto excessivo de surfactante, os limites mínimo e máximo da concentração de SDS foram de 80 mmol L<sup>-1</sup> ( $-\sqrt{2}$ ) e 220 mmol L<sup>-1</sup> ( $+\sqrt{2}$ ) respectivamente, de modo a garantir que o valor de 150 mmol L<sup>-1</sup> fosse o ponto central (nível zero).

Fatoras			Níveis		
Fatores	-√2	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
[SDS] (mmol L <sup>-1</sup> )	80	100	150	200	220
pН	4,5	5,0	6,3	7,5	8,0

Tabela 10. Relação dos níveis codificados e reais para os fatores do planejamento fatorial composto central, CCD,  $2^2$ .

O planejamento fatorial CCD proposto gerou 11 fases móveis micelares de diferentes concentrações de SDS e de valores de pH, varrendo do pH ácido ao levemente básico como detalhado na Tabela 11. As combinações foram geradas com auxílio do programa Statistica (versão 7.0, Statsoft, USA) assim como a ordem aleatória escolhida para o estudo. As fases móveis micelares de números 9, 10 e 11 são de composição idêntica para efeito de cálculo do erro puro. Para o teste de cada fase móvel micelar foi preparada uma solução de mistura das seis β-

carbolinas (na mesma concentração) diluindo a solução estoque na própria fase móvel micelar em teste.

Nº da fase móvel	Concentração de SDS	ъЦ	Níveis coo	lificados
micelar	$(\text{mmol } L^{-1})$	рп	SDS	pН
1	100	5,0 <sup>a</sup>	-1	-1
2	100	$7,5^{\mathrm{b}}$	-1	1
3	200	5,0 <sup>a</sup>	1	-1
4	200	$7,5^{b}$	1	1
5	80	6,3 <sup>b</sup>	-√2	0
6	220	6,3 <sup>b</sup>	$\sqrt{2}$	0
7	150	4,5 <sup>a</sup>	0	-√2
8	150	$8,0^{b}$	0	$\sqrt{2}$
9	150	6,3 <sup>b</sup>	0	0
10	150	6,3 <sup>b</sup>	0	0
11	150	6,3 <sup>b</sup>	0	0

Tabela 11. Descrição da composição das 11 fases móveis micelares em função da concentração de SDS e do valor de pH.

<sup>a</sup> Fase móvel tamponada acetato de sódio/ ácido acético;

<sup>b</sup> Fase móvel tamponada com hidrogenofosfato de sódio/ácido fosfórico.

Os dois critérios de decisão considerados para a escolha da fase móvel micelar para o método foram a resolução de separação entre os picos e o menor tempo total de corrida, sendo que a resolução foi prioritária em relação ao tempo de corrida. Na Tabela 12 são detalhadas as características mais relevantes observadas nos cromatogramas obtidos com cada fase móvel micelar testada.

De um modo geral, as fases móveis de mesma concentração de SDS resultaram em tempos totais de corrida similares, como é o caso das fases 1 e 2 (100 mmol  $L^{-1}$  de SDS), 3 e 4 (200 mmol  $L^{-1}$  de SDS) e 7 a 11 (150 mmol  $L^{-1}$  de SDS). O aumento da concentração de SDS diminuiu o tempo de corrida cromatográfica, independentemente do valor do pH. Esses resultados indicam que a quantidade de micelas é que define o padrão de eluição geral dos alcalóides em virtude da maximiação da interação micela-analito em relação à interação analito-fase estacionária.

Nº da fase móvel micelar	Tempo de corrida <sup>a</sup> (min)	Eficiência de separação
1	43	Co-eluição do analitos NOR/HIE/HLINE
2	44	Separação dos seis picos cromatográficos
3	26	Co-eluição do analitos HOL/HLOL e NOR/HIE/HLINE
4	27	Separação dos seis picos cromatográficos
5	51	Co-eluição do analitos HOL/HLOL e NOR/HIE/HLINE
6	24	Co-eluição do analitos HOL/HLOL e NOR/HIE/HLINE
7	31	Co-eluição do analitos HOL/HLOL e NOR/HIE/HLINE
8	32	Separação dos seis picos cromatográficos
9, 10 e 11	32	Co-eluição do analitos HOL/HLOL e NOR/HIE/HLINE

Tabela 12. Relação entre o número da fase móvel micelar, o tempo total de corrida e a eficiência de separação entre os seis alcaloides.

<sup>a</sup> baseado no tR do analito mais retido.

A resolução dos picos (eluição relativa) teve uma maior relação com o valor do pH da fase móvel. Quanto mais básico foi o pH da fase, melhor a separação alcançada entre os analitos, principalmente entre NOR/HIE/HLINE. O cromatograma da fase 2 (pH 7,5) apresentou os seis picos cromatográficos plenamante separados , enquanto que com a fase 1 (pH 5,0) houve uma coeluição parcial do par HOL/HLOL e uma sobreposição crítica para os analitos NOR/HIE/HLINE. A comparação dos resultados obtidos pelas corridas das fases 3 e 4 e pelas fases de 7 a 11 mostraram a mesma tendência.

A fase móvel 5 teve menor concentração de SDS (80 mmol  $L^{-1}$ ) dentre todas as fases testadas e pH intermediário de 6,3. Esta fase apresentou uma piora na separação entre os analitos HOL/HLOL e o maior tempo de corrida, comparado com as outras fases. O perfil cromatográfico dos picos correspondentes ao NOR/HIE/HLINE não se mostrou bem resolvido, aparecendo apenas dois picos.

Na Figura 30 são mostrados os cromatogramas obtidos pelas fases que apresentaram melhor resolução dentre as onze testadas: fase 2 (A), fase 8 (B) e fase 4 (C). A ordem de eluição dos picos é a mesma para os três cromatogramas

apresentados na Figura 20. Comparando as fases 2 (100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 7,5), 4 (200 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 7,5) e 8 (150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 8,0), as quais possuem valor de pH próximos e se distiguem pela concentração de SDS, observou-se uma melhora significativa no tempo total de corrida em função do aumento da concentração de SDS. Porém, a fase de número 8, dentre essas três fases, foi a que resultou em separação na linha de base entre HAE/NOR/HIE.



Figura 30. Cromatogramas obtidos de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> em diferentes fases móveis micelares: Fase 2: 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 7,5 (A), Fase 8: 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 8,0 (B) e Fase 4: 200 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 7,5 (C). Todos os cromatogramas foram gerados em vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 25°C, volume introduzido de amostra de 20 µL. As proporções de (Et)<sub>3</sub>N e de ACN foram 0,5% e 5%, respectivamente. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

A análise final dos resultados desse planejamento experimental, de forma a se escolher a condição de trabalho, não foi delineada por meio dos gráficos de superfícies de resposta, gráficos de Pareto e nem por meio da análise estatística ANOVA, devido a complexidade em avaliar dados advindos de um conjunto de seis picos cromatográficos (no mínimo os dois conjuntos mais críticos). Apesar disso, o estabelecimento da melhor condição foi simples e com base no conhecimento prévio do processo e das limitações experimentais e instrumentais, e no perfil de separação dos seis alcaloides.

Em resumo, percebeu-se que o tempo de corrida é influenciado significativamente pela concentração de SDS e que quanto mais surfactante, menor o tempo de corrida. A melhoria da resolução entre os picos cromatográficos é influenciado pelo pH, onde o valor máximo de pH testado (limitado pela característica da fase estacionária ) produziu os melhores

resultados. O cromatograma resultante da fase 6 ([SDS] = 220 mmol L<sup>-1</sup> e pH 6,3) não produziu bons resultados de resolução entre os picos, mas o tempo total de corrida cromatográfica foi reduzido para 24 min. Em contrapartida, a fase 8 ([SDS] = 150 mmol L<sup>-1</sup> e pH 8,0) produziu melhor separação entre os picos e o tempo de corrida foi igual a 30 min. Com base nesses resultados, decidiu-se realizar um experimento univariado adicional analisando o comportamento de retenção na concentração de SDS de 220 mmol L<sup>-1</sup> em pH 8,0.

Na Figura 31 é apresentado o cromatograma obtido para os seis alcaloides em fase móvel micelar com valor de pH 8,0 e concentração de SDS igual a 220 mmol  $L^{-1}$  (cromatograma A). Para efeito de comparação foi incluido também o cromatograma obtido com a fase móvel 8 (cromatograma B), cuja concentração de SDS é 150 mmol  $L^{-1}$ . Com já era esperado, a eficiência de separação foi bastante semelhante ao da fase móvel 8, porém o tempo total de corrida reduziu em, aproximadamente, 6 min.



Figura 31. Superposição dos cromatogramas resultantes das injeções de uma mistura das seis  $\beta$ -carbolinas de concentração 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> em duas fases móveis distintas: 220 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 8,0 (A) e 150 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e pH 8,0 (B). Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 25°C, volume introduzido de amostra de 20 µL. As proporções de (Et)<sub>3</sub>N e de ACN foram 0,5% e 5%, respectivamente. Os pares de  $\lambda_{exc/em}$  para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

Como só se havia testado a variação de proporção de ACN (em volume) para um valor muito maior do que 5% e encontrado um efeito não significativo, um estudo complementar final foi realizado de tal forma a se verificar o efeito da redução da proporção de ACN para um valor abaixo de 5%, usando as condições estabelecidas para pH e concentração de SDS (ajuste fino). Assim, a proporção de ACN foi reduzida para 3% e não foi observado o comprometimento da eficiência de separação entre os analitos, como pode ser observado na Figura 32. Portanto, a porcentagem de 3 a 5% de ACN constitui uma faixa robusta para esse método proposto. O tempo de retenção total teve um aumento de 5 min quando se utiliza 3% de ACN, porém o consumo de solvente orgânico foi reduzido em 24%, acarretando, em grande escala, na redução do custo das análises.



Figura 32. Cromatogramas resultantes das injeções de uma mistura das seis β-carbolinas na concentração 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> (exceção para HAE, NOR e HIE, no cromatograma B, cuja concentração foi de 5 x  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) com proporção de ACN (v/v) de 5% (A) e 3% (B). Composição da fase móvel micelar: tampão fosfato (10 mmol  $L^{-1}$ ; pH 8,0), contendo 220 mmol  $L^{-1}$ de SDS e 0,5% de (Et)<sub>3</sub>N. Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 25°C e volume de injeção de 20 μL. Os pares de λ<sub>exc/em</sub> para leitura dos alcaloides foram HOL/HLOL: 356/479, HAE/HIE/NOR/HLINE: 370/435 nm.

Na Figura 33 é apresentada uma sobreposição dos cromatogramas obtidos, em todos os canais de detecção fluorimétrica em uma corrida utilizando os parâmetros cromatográficos escolhidos.



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 mmol L<sup>-1</sup>; pH 8,0), contendo 220 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 0,5% (Et)<sub>3</sub>N e 3% de ACN. Vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna  $25^{\circ}$ C e volume introduzido de amostra de 20 µL.

Na Tabela 13 e na Tabela 14 são apresentados, respectivamente, o programa final de detecção das  $\beta$ -carbolinas em função dos tempos de retenção na condição escolhida para o método de separação em MLC e as condições escolhidas para realizar a separação cromatográfica das seis  $\beta$ -carbolinas por MLC.

Tabela 13. Programação de detecção fluorimétrica das seis  $\beta$ -carbolinas durante o processo de separação por MLC. Condições cromatográficas da Tabela 14.

β-carbolina	Tempo de corrida (min)	λ <sub>exc</sub> (nm)	λ <sub>em</sub> (nm)				
			Canal A	Canal B	Canal C	Canal D	
HOL/HLOL	0,0-14,5	356	479	410	435	500	
HAE/NOR/HIE/ HLINE	15,0-30,0	370	435	447	495	416	

Tabela 14: Condições do método de MLC para seis  $\beta$ -carbolinas.

Parâmetros		Condições otimizadas		
Coluna cromatográfica		Zorbax C18 4,6x150 mm, dp 5µm		
Composição da fase móvel micelar		Solução tamponada com hidrogenofosfato de sódio:ácido fosfórico (10 mmol L <sup>-1</sup> ) ajustado para pH 8,0 contendo SDS (220 mmol L <sup>-1</sup> ) e 0,5% (Et) <sub>3</sub> N		
Modificador orgânico (proporção	o em volume)	ACN (3%)		
Vazão da fase móvel		0,6 mL min <sup>-1</sup>		
Temperatura da coluna		25 °C		
Tempo total da corrida		30 min		
	HOL	11,8 min (356/410 nm)		
	HLOL	13,5 min (356/500 nm)		
$\mathbf{T}$ $(1, 1, 2, 2, 2)$	HAE	17,9 min (370/447 nm)		
Tempo de retenção ( $\lambda_{exc/em}$ )	NOR	19,3 min (370/435 nm)		
	HIE	21,7 min (370/416 nm)		
	HLINE	26,3 min (370/495 nm)		
Volume introduzido de amostra		20 µL		
Tipo de eluição		Isocrática		

## Validação do método proposto

A próxima etapa do desenvolvimento do método foi à validação por meio da obtenção dos seguintes parâmetros analíticos de mérito (PAM): faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), curva analítica, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão (recuperação). Além disso, foi feito estudo de interferência e a comparação entre métodos. Todas as avaliações seguiram as orientações do documento normativo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2010) e Manual da Garantia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Adicionalmente foi realizado o cálculo da estimativa das incertezas associadas à quantificação das seis β-carbolinas. Porém, antes do processo de validação fez-se necessário um estudo da estabilidade dos alcaloides β-carbolinas em solução micelar.

## 4.2.1 Estudo de estabilidade das β-carbolinas

O estudo para avaliar a estabilidade das  $\beta$ -carbolinas teve como objetivo garantir que o tempo usual de armazenamento das soluções padrões dos alcaloides, nas condições estabelecidas para essas soluções, seria adequado para garantir a estabilidade necessária para as análises.

Para tal estudo preparou-se soluções de cada um dos alcaloides, em fase móvel micelar na composição otimizada, cujas concentrações foram: HOL 197 ng g<sup>-1</sup>; HLOL 199 ng g<sup>-1</sup>; HAE 181 ng g<sup>-1</sup>; NOR 148 ng g<sup>-1</sup>; HIE 239 ng g<sup>-1</sup> e HLINE 120 ng g<sup>-1</sup>. Essas soluções, logo no primeiro dia de preparo, tiveram sua intensidade de sinal fluorescente medida nas condições cromatográficas estabelecidas para o método de MLC indicadas na Tabela 13 e Tabela 14. As soluções foram guardadas em frascos de vidro, protegidos da incidência da luz ambiente com papel alumínio, e mantidas sob refrigeração a 4°C.

A variabilidade das medições entre os dias estudados foi calculada a partir da média das áreas dos picos cromatográficos, do desvio padrão e do coeficiente

de variação (CV, %) em relação aos três dias das análises. Nesse estudo, assumiuse que ao longo desses três dias a variação de radiância da fonte de excitação do cromatógrafo não variou significantemente de tal forma que as eventuais diminuições significativas de sinal medido foram atribuídas a degradação dos analitos.

Os resultados indicados na Tabela 15 mostraram que faixa encontrada para o CV foi de 0,4 a 10%, dependendo do alcaloide estudado. Embora de forma incompleta, esse estudo foi de fundamental importância para que se estimasse ao tempo máximo de armazenamento das soluções em meio micelar. As soluções de HAE, NOR e HIE apresentaram uma instabilidade se usadas após três dias do seu preparo, enquanto que as demais se mostraram estáveis nesse mesmo tempo, mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Tabela 15. Áreas dos picos cromatográfico correspondente para cada  $\beta$ -carbolina no período de estudo de estabilidade.

Dia de injeção	Área do pico <sup>a</sup>						
	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE	
1°	1071,5	1040,5	584,1	219,9	863,4	1525,9	
2 °	1050,8	1036,5	539,3	206,4	874,2	1529,7	
3 °	986,9	1032,2	473,9	180,9	775,6	1551,7	
Média	1036,4	1036,4	532,4	202,4	837,7	1535,8	
Desvio padrão	44	4	55	20	54	14	
CV <sup>b</sup>	4	0,4	10	10	7	1	

<sup>a</sup> Média da área do pico expressa em unidade arbitrária (ua).

<sup>b</sup>CV (coeficiente de variação, expresso em %) = (desvio padrão/média das áreas)\*100.

Vale salientar que em condições de refrigeração, se observou formação de corpo de fundo nas soluções micelares, no caso, parte do surfactante presente no meio. Nesses casos, as soluções foram agitadas e introduzidas no banho de água, sob efeito de ultrassom, até que se atingisse temperatura ambiente a homogeneidade visual destas soluções foi novamente alcançada.

### 4.2.2 Parâmetros Analíticos de Mérito

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir de injeções de soluções individuais de cada analito em concentrações conhecidas e decrescentes até que fosse atingido o menor pico passível de integração pelo *software* do cromatógrafo. Após achar a concentração correspondente ao limite inferior detectável, foi construída uma curva analítica com um intervalo de concentração reduzido (com apenas quatro pontos de concentrações distintas). Uma solução com a concentração correspondente ao limite inferior detectável foi analisada dez vezes com o método de MLC proposto. A média dos resultados, em concentração, *X*, e seu desvio padrão, *s*<sub>b</sub>, foram usados para o calculo do LOD (*X* + 3 *s*<sub>b</sub>) e do LOQ (*X* + 10 *s*<sub>b</sub>). Os valores absolutos de LOD (ALOD) e LOQ (ALOQ) foram calculados considerando a massa molar de cada analito, o volume de solução introduzido no sistema cromatográfico (20  $\mu$ L) e os valores de LOD ou LOQ.

A curva analítica completa foi construída a partir uma série de soluções de sete concentrações distintas para cada analito (valores para cada  $\beta$ -carbolina indicados na Tabela 16 com a simbologia de C1, para a menor concentração, ou seja, o valor de LOQ, até C7, para a maior concentração). Para as soluções C2, C3, C5 e C6 foram preparadas três réplicas autênticas, enquanto que para as soluções C1, C4 e C7 foram preparadas cinco réplicas autênticas para o cálculo da repetibilidade. As concentrações dessas soluções foram determinadas em dias diferentes para o cálculo da precisão intermediária. As soluções utilizadas na construção da curva analítica e estudo da repetibilidade foram preparadas no dia da análise. As mesmas soluções foram utilizadas no dia posterior para a avaliação da precisão intermediária.

Soluções –	Concentração das β-carbolinas (ng g <sup>-1</sup> )					
	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE
C1	4,15	1,81	2,18	3,91	4,43	2,07
C2	9,88	5,97	5,45	8,33	16,87	6,41
C3	15,82	15,94	9,08	13,34	21,08	17,06
C4	19,77	19,91	14,51	16,66	105,42	21,31
C5	98,85	99,56	18,14	83,30	210,84	106,56
C6	158,16	199,12	90,78	166,59	1054,18	638,49
C7	420,65	409,02	181,38	832,96	1695,85	1276,98

Tabela 16. Concentrações das soluções padrões de  $\beta$ -carbolinas, em ng g<sup>-1</sup>, utilizadas na construção da curva analítica.

A partir dos resultados foram construídas as curvas analíticas considerando as concentrações, em ng g<sup>-1</sup>, das soluções padrões em função das áreas dos picos cromatográficos, em unidades arbitrárias de sinal, utilizando o método dos mínimos quadrados de regressão de tal forma a se obter as equações do modelo de calibração (equação da reta) e os valores de R<sup>2</sup> e R<sup>2</sup> ajustado, que indiquem a qualidade do modelo linear. A regressão linear foi feita com todos os valores das replicas, e não com as respectivas médias, para não minimizar os graus de liberdade.

Como a faixa escolhida abrange uma faixa muito grande de concentração, decidiu-se por agrupar as concentrações apenas das quatro primeiras soluções (C1 a C4) nos cálculos de incerteza (para a minimização de incerteza da curva). As curvas reduzidas e suas equações de reta foram utilizadas no cálculo de repetibilidade e de precisão intermediária para a concentração C1. Para as concentrações C4 e C7 foram utilizadas equações das curvas analíticas completas. Vale ressaltar, que a concentração C7 está abaixo do limite superior de concentração da faixa linear para todas as  $\beta$ -carbolinas.

A avaliação da linearidade das curvas analíticas assim como a comprovação da homocedasticidade das variâncias foi feita por meio do cálculo dos resíduos, ou seja, pela diferença entre a área de pico calculada pela equação da curva e a área de pico experimental obtida por meio da integração. A significância da diferença entre os valores das áreas calculadas e as experimentais foi determinada utilizando a ANOVA (teste-F). Na Figura 34, Figura 35, Figura 36, Figura 37, Figura 38 e Figura 39 são apresentadas as curvas analíticas (completa e reduzida) e o gráfico de resíduos padronizados (razão do valor do

resíduo pelo erro puro) em função da concentração correspondente, em ng g<sup>-1</sup> para os alcaloides HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE, respectivamente. Cada curva analítica completa (A) possui uma demarcação (círculo) envolvendo os quatro primeiros pontos, indicando a faixa da curva analítica reduzida (B). Os valores de R<sup>2</sup> ajustado indicaram comportamento linear adequado para a resposta analítica produzida pelos seis alcaloides. Pode se observar nos gráficos de resíduos (C) uma distribuição aleatória e, portanto, não tendenciosa dos desvios, indicando homocedasticidade das variâncias.



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



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



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



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



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



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

Os parâmetros analíticos de mérito obtidos para as  $\beta$ -carbolinas com o método por MLC são apresentados na Tabela 17. As equações das retas para as seis curvas analíticas completas e para as respectivas faixas agrupadas nas concentrações iniciais (faixa reduzida), e os respectivos valores de R<sup>2</sup>, também são apresentados. Os valores de precisão, na forma de repetibilidade e precisão intermediária, também foram incluídos na Tabela 17.

Ao se compararem as equações da reta, observa-se que a curva analítica para HLINE possui a maior inclinação, isto é, o método para esse analito é o mais sensível, enquanto que para NOR, a sensibilidade foi a menor. Outra comparação relativa é que a diferença (a maior diferença) entre a área do pico para uma mesma concentração de NOR e HLINE é de oito vezes.

O coeficiente de correlação para as curvas de todos os analitos ficou próximo de 1, indicando que as equações da reta se ajustam ao modelo linear. Os menores valores de LOD e LOQ foram os obtidos para o HLOL (1,5 e 1,8 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (1,5 e 2,1 ng g<sup>-1</sup>). Os valores dos limites absolutos de detecção (0,03 a 0,07 ng) e de quantificação (0,04 a 0,09 ng) podem ser considerados baixos, quando se compara com os limites absolutos de detecção (0,005 a 0,2 ng) e quantificação (0,016 a 1 ng) descritos pelas principais metodologias de
quantificação das  $\beta$ -carbolinas em HPLC (Yritia et al., 2002; Abourashed et al., 2003; Back et al., 2009 e González-Ruiz et al., 2011).

Para o cálculo de repetibilidade e de precisão intermediária foi utilizada a estatística ANOVA, e todos os valores calculados para F ( $F_{calculado}$ ) ficaram abaixo do valor crítico de F ( $F_{tabelado}$  (5;0,05) = 5,318) para 95% de limite de confiança. Esses resultados indicaram que há uma homogeneidade nas variâncias dentro dos grupos (repetibilidade) e entre os grupos (precisão intermediária) para todos os três níveis de concentração avaliados para as seis  $\beta$ -carbolinas. Todos os valores de repetibilidade e de precisão intermediária foram menores que 5%, sendo que os valores para C1 são maiores do que para C4 e C7, como esperado, já que quanto menor o valor de concentração, maior a variabilidade relativa de sinal. A precisão intermediária atingiu valores para C1 de no máximo 3% para HAE e para o C7 e o máximo de 0,1% para HOL, HLOL e HAE. Os valores de repetibilidade e a precisão intermediária são apresentados na Tabela 18 na forma de coeficiente de variação (CV %). Esses valores também foram transformados em concentração, em ng g<sup>-1</sup>, de forma a usá-los nos cálculos das incertezas combinadas.

Com base nos resultados pode-se concluir que o método é preciso, nos três níveis de concentração avaliados para os seis alcaloides. Observou-se que os valores de precisão intermediária são menores que os encontrados para a repetibilidade devido ao preparo das réplicas autênticas que agregou maior desvio que a repetição das medidas da mesma solução em dias consecutivos.

Parâmetros de Mérito	HOL	HLOL
$LOD (ng g^{-1})$	3,60	1,50
ALOD (ng)	0,07	0,03
$LOQ (ng g^{-1})$	4,10	1,80
ALOQ (ng)	0,08	0,04
Faixa de Trabalho (ng g <sup>-1</sup> )	4,2-420,6	1,8-409,0
Curva analítica completa (sensibilidade em ng g <sup>-1</sup> )	$y = (4,40 \pm 0,01)$ x - (3,2 ± 1,1)	y = $(6,10 \pm 0,01)$ x + $(4,1 \pm 1,3)$
R <sup>2</sup> ajustado	0,9999	0,9999
Faixa reduzida, agrupada (ng g <sup>-1</sup> )	4,2-19,8	1,8 – 19,9
Curva analítica reduzida	$y = (4,40 \pm 0,02)$	$y = (6,10 \pm 0,04) x$
(sensibilidade em ng g <sup>-1</sup> )	$x - (0,3 \pm 0,3)$	$+(1,2\pm0,6)$
R <sup>2</sup> ajustado	0,9995	0,9997

Tabela 17. Parâmetros analíticos de mérito obtidos para as β-carbolinas em condições previamente otimizadas para a sua determinação por MLC.

HAE

2,00

0,04

2,20

0,04

2,2 - 181,4

 $y = (3,600 \pm$ 

0,003) x – (0,8 ±

0,3)

1,0000

2,2 - 14,5

NOR

2,80

0,06

3,90

0,08

3,9 - 833,0

 $y = (1,500 \pm 0,002)$ 

 $x + (5,6 \pm 0,7)$ 

0,9999

3,9 - 16,7

HIE

2,90

0,06

4,50

0,09

4,5 - 1695,8

 $y = (3,600 \pm 0,002)$ 

 $x + (1, 1 \pm 1, 3)$ 

0,9999

4,5 - 105,4

Curva analítica rec (sensibilidade em r	luzida ng g <sup>-1</sup> )	$y = (4,40 \pm 0,02) \\ x - (0,3 \pm 0,3)$	y = $(6,10 \pm 0,04)$ x + $(1,2 \pm 0,6)$	$y = (3,50 \pm 0,03)$ x + (0,3 ± 0,3)	y = $(1,80 \pm 0,02)$ x + $(1,3 \pm 0,3)$	y = $(3,60 \pm 0,01)$ x + $(2,9 \pm 0,6)$	y = $(12,10 \pm 0,08)$ x - $(1,6 \pm 1,2)$
R <sup>2</sup> ajustado		0,9995	0,9997	0,9987	0,9973	0,9999	0,9994
D (1111-1-1	C1	3	5	4	5	3	1
Repetibilidade	C4	1,4	0,4	0,8	3,2	0,4	0,1
(CV, 70)	C7	0,3	0,1	0,2	0,03	0,1	0,01
Precisão	C1	1	2	3	1	1	2
intermediária	C4	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3
(CV, %)	C7	0,1	0,1	0,1	0,004	0,05	0,02

C1: HOL (4,15 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (1,8 ng g<sup>-1</sup>), HAE (2,2 ng g<sup>-1</sup>), NOR (3,9 ng g<sup>-1</sup>), HIE (4,4 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (2,1 ng g<sup>-1</sup>). C4: HOL (19,8 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (19,9 ng g<sup>-1</sup>), HAE (14,5 ng g<sup>-1</sup>), NOR (16,7 ng g<sup>-1</sup>), HIE (105,4 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (21,3 ng g<sup>-1</sup>). C7: HOL (420,7 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (409 ng g<sup>-1</sup>), HAE (181,4 ng g<sup>-1</sup>), NOR (833 ng g<sup>-1</sup>), HIE (1695,8 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (1277 ng g<sup>-1</sup>).

HLINE

1,50

0,03

2,10

0,04

2,1 - 1277,0

 $y = (12,700 \pm$ 

0,002) x – (8,9  $\pm$ 

1,2)

0,9999

2,1-21,3

## 4.2.3 Estimativa da Incerteza de medição

Para os cálculos de incertezas, todas as concentrações das  $\beta$ -carbolinas foram expressas em concentração relativa em massa na unidade de ng g<sup>-1</sup> para se evitar incertezas significantemente maiores associadas aos volumes dos balões volumétricos e das micropipetas, e com isso minimizar, a incerteza combinada. Assim, o procedimento utilizado para a preparação das soluções se baseou na medição de massa. Muito embora já seja possível avaliar a qualidade da resposta analítica a partir dos parâmetros de mérito já investigados, a estimativa da incerteza associada à medição da concentração das  $\beta$ -carbolinas foi realizada a fim de atribuir a essa medição uma maior confiabilidade. Para tanto, se fez necessário o estudo das principais fontes de incerteza de medição associadas à determinação de  $\beta$ -carbolinas por MLC. Uma vez agrupadas, as incertezas de cada grupo devem ser estimadas para posteriormente se calcular as incertezas combinada ( $u_c$ ) e expandida ( $U_{k=2;95\%}$ ).

## 4.2.4 Fontes de incerteza

As principais fontes de incerteza selecionadas, definidas no Capítulo 2, que influenciariam na medição da concentração das  $\beta$ -carbolinas por MLC foram: (i) preparo das soluções, a partir da pesagem das massas dos padrões dos alcaloides ( $u_{sol}$ ), (ii) repetibilidade ( $u_r$ ), (iii) precisão intermediária ( $u_{pi}$ ) e (iv) curva analítica ( $u_{curva}$ ).

Afim de minimizar os efeitos das fontes de incerteza no cálculo da concentração em C1, além da preparação das soluções pelo ajuste de massa dos componentes, os parâmetros relativos à sensibilidade e ao coeficiente linear utilizados no cálculo da incerteza foram os da curva analítica reduzida. Para ter uma ideia do impacto dessa escolha, no caso do HOL houve uma diminuição de 73% na incerteza associada à curva analítica reduzida do C1 quando comparada à curva completa. Para o segundo (C4) e o terceiro (C7) nível da curva foi considerada a incerteza da curva completa no cálculo da incerteza expandida.

Com a preparação da solução feita pelo ajuste de massa, a influência da  $u_{sol}$  passou a ser a fonte de impacto menor na  $u_c$ . Por exemplo, para o HOL, o valor de  $u_c$  é significativamente menor com o ajuste de massa do que quando as soluções do analito foram preparadas por ajuste de volume, diminuindo de 53 para 4% para C1.

#### 4.2.5

### Incerteza associada ao Preparo da Solução (usol)

Para o cálculo da incerteza associada ao preparo da solução,  $u_{sol}$  (Equação 57), das β-carbolinas todas as soluções e alíquotas foram pesadas. O procedimento adotado foi o de pesagem do balão volumétrico contendo a solução do analito, pesagem do balão vazio e pesagem referente aos volumes das micropipetas utilizados nas diluições. As soluções de concentração menores (C1 a C4), utilizadas na construção da curva analítica, foram preparadas a partir de uma solução intermediária, proveniente da diluição da solução estoque, enquanto que as concentrações C5 a C7 foram preparadas por apenas uma diluição da solução estoque. A massa do analito foi então divida pela massa da solução e a concentração final expressa em ng g<sup>-1</sup>. As incertezas  $u_{bal}$  (Equação 58),  $u_{fdil}$  (Equação 59) e  $u_{sol}$  foram calculadas para todas as β-carbolinas nos três níveis de concentração C1, C4 e C7 e seus valores estão apresentados na Tabela 18.

Os valores de  $u_{bal}$  (ng g<sup>-1</sup>) apresentaram valores muito próximos, 0,01 ng g<sup>-1</sup>, para todas as  $\beta$ -carbolinas, já que a concentração da solução estoque dos alcaloides foi da mesma magnitude.

A incerteza associada à diluição das soluções,  $u_{fdil}$ , no nível C1 foi maior para HLOL e HLINE, pois esses analitos tiveram o menor LOQ. Fez-se necessário uma maior diluição da solução intermediária acarretando em uma maior incerteza associada à diluição. Portanto, conclui-se que quanto maior o nível de concentração, menor o fator de diluição, e consequentemente, menor a incerteza  $u_{fdil}$ , desta forma, a incerteza associada ao preparo da solução é mais significativa no nível C1. Para todos os alcaloides os valores de  $u_{sol}$  calculados para os níveis C4 e C7 não contribuíram significativamente na incerteza combinada,  $u_c$ .

#### 4.2.6

## Incerteza associada aos Parâmetros da Curva Analítica (ucurva)

Para o cálculo da incerteza associada às curvas analíticas foram consideradas curvas com sete níveis da variável independente (concentração) dentro da faixa linear para cada alcaloide, medidos em três réplicas autênticas. A área do pico cromatográfico foi usada como resposta analítica. Os valores calculados referentes às incertezas do coeficiente linear,  $u_b$  (Equação 50), e do coeficiente de sensibilidade,  $u_m$  (Equação 51), e incerteza associada à curva analítica ( $u_{curva}$ ) estão mostrados na Tabela 18.

A curva analítica para o alcaloide HIE resultou em maior incerteza. Para esse alcaloide, a incerteza associada à sensibilidade da curva foi maior tanto para curva analítica completa quanto para reduzida, indicando que os dados obtidos apresentaram os maiores desvios quando comparado aos demais alcaloides. Isso repercutiu nas incertezas das curvas completa e a reduzida ( $u_{curva}$  0,6 e 0,2 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente) do HIE, que é a maior dentre todos os alcaloides. O analito HAE apresentou o menor valor de  $u_{curva}$  (0,1 ng g<sup>-1</sup>) para curva completa e HOL obteve o menor valor de  $u_{curva}$  (0,06 ng g<sup>-1</sup>) para a curva reduzida.

#### 4.2.7

#### Incerteza associada à Repetibilidade ( $u_r$ ) e a Precisão Intermediária ( $u_{pi}$ )

O cálculo da incerteza associada à repetibilidade e a precisão intermediária foi feito em três níveis de concentração para cada alcaloide, início, meio e fim da curva analítica, C1, C4 e C7, respectivamente. Foram preparadas cinco réplicas autênticas de cada uma dessas concentrações para se calcular o desvio padrão da repetibilidade,  $s_r$  (Equação 55). Estas soluções foram analisadas em dias consecutivos para o cálculo da

precisão intermediária,  $s_{pi}$  (Equação 56). Os valores (desvio padrão, s) de repetibilidade e da precisão intermediária já foram mostrados na Tabela 17 em termos percentuais de coeficiente de variação. Na Tabela 18 os valores de incerteza são mostrados na forma de desvio padrão, em ng g<sup>-1</sup>, para os três níveis de concentração.

O maior valor de  $u_r$  foi associado ao C1 da HAE, enquanto que o menor foi para o HOL. Porém, todas as incertezas associadas à repetibilidade ficaram abaixo de 5%. Como já comentado, os desvios em relação à repetibilidade foram maiores do que os da precisão intermediária em função das variações no preparo das soluções em réplicas autênticas.

## 4.2.8 Incerteza Combinada (u<sub>c</sub>) e Incerteza Expandida (U)

Uma vez identificadas e agrupados os componentes de incerteza, a quantificação dos mesmos foi realizada para serem combinados de modo a se obter os valores de  $u_c$  (Equação 60) e de  $U_{k=2;95\%}$  (Equação 61) associados à medição da concentração, considerando o k igual a 2 (nível de confiança 95%). A incerteza combinada foi calculada pela raiz quadrada da soma quadrática das fontes de incertezas individuais, considerando que todas as quatro componentes de incerteza são independentes entre si (sem covariância). Se uma dessas fontes contribuir mais significativamente para a incerteza do que as outras, esta é a que controla a incerteza global do processo e, portanto, a que deve ser avaliada a fim de melhorar a qualidade do resultado da medição. Os valores das incertezas associadas às componentes identificados no diagrama de causa e efeito e as respectivas incertezas combinada e expandida estão mostrados na Tabela 18 para cada alcaloide estudado.

A incerteza na medição é melhor visualizada quando se calcula o coeficiente de variação, em %. A maior incerteza associada à medição da concentração da  $\beta$ -carbolina foi para o primeiro nível, C1, dos alcaloides HLOL e HAE (9%). Os demais apresentaram incertezas inferiores a esse valor, chegando a 0,03% para C7 do HLINE.

Fontos do Incontoros		Valores das incertezas						
Fontes de Incertez	las	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE	
	$u_m$	1,1	1,6	0,06	0,4	1,8	1,4	
Curva analítica (sensibilidade em ng g <sup>-1</sup> )	$u_{\rm b}  {\rm x10^{-6}}$	30	40	9	3	3	4	
	<i>u<sub>curva</sub></i>	0,4	0,4	0,1	0,9	0,6	0,2	
	$u_m$	0,09	0,3	0,1	0,08	0,5	1,4	
Curva reduzida (sensibilidade em ng g <sup>-1</sup> )	$u_{\rm b}  {\rm x10}^{-4}$	4,8	18	9	5,5	1	69	
	<i>u<sub>curva</sub></i>	0,06	0,08	0,09	0,1	0,2	0,09	
	C1	0,1	0,09	0,1	0,2	0,2	0,05	
$u_r$ (ng g <sup>-1</sup> )	C4	0,1	0,07	0,1	0,5	0,5	0,07	
	C7	1,2	0,4	0,4	0,3	1,6	0,3	
	C1	0,06	0,04	0,08	0,04	0,06	0,02	
$(\operatorname{ng} \operatorname{g}^{-1})$	C4	0,02	0,06	0,02	0,06	0,2	0,01	
	C7	0,5	0,3	0,1	0,03	0,8	0,2	
$u_{bal}$ (ng g <sup>-1</sup> )		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	C1	54 (1)	117 (1)	92 (1)	54 (1)	60 (1)	112 (1)	
(adimensional)	C4	13 (1)	13 (1)	15 (1)	15 (1)	7 (3)	13 (1)	
(%)	C7	3 (5)	3 (5)	7 (6)	0,8 (3)	0,7 (5)	1 (7)	
	C1	0,08	0,1	0,1	0,08	0,09	0,1	
$u_{sol}$ (ng g <sup>-1</sup> )	C4	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	
	C7	0,02	0,02	0,03	0,09	0,01	0,01	
	C1	0,2 (4)	0,2	0,2 (9)	0,3 (7)	0,3 (7)	0,2 (7)	
$u_{\rm c} \left( \log {\rm g}^{-1} \right)$	C4	0,5	0,4	0,2	1,0	0,8	0,2	
(%)	C7	(2) 1,3	(2) 0,6	(1) 0,4	(6) 0,9	(1) 1,9	(1) 0,4	
	C1	(0,3)	(0,2)	(0,2)	(0,1)	(0,1)	(0,03)	
$U_{a} \circ \operatorname{org}(\operatorname{ng} \operatorname{g}^{-1})$		1	0,4	0,4	2.0	1.6	0,4	
(K=2; 95%) ( <b>115</b> 6 )	C7	2.7	1.2	0.8	1.8	3.8	0.7	
$u_{\rm c} (\rm ng \ g^{-1})$ (%) $U_{\rm (k=2;\ 95\%)} (\rm ng \ g^{-1})$	C1 C4 C7 C1 C4 C7	$0,2 \\ (4) \\ 0,5 \\ (2) \\ 1,3 \\ (0,3) \\ 0,4 \\ 1 \\ 2,7 \\ 0,2 \\ 1 \\ 2,7 \\ 0,2 \\ 0,4 \\ 1 \\ 0,4 \\ 0,4 \\ 1 \\ 0,5 \\ 0,4 \\ 0,5 $	$0,2 \\ (9) \\ 0,4 \\ (2) \\ 0,6 \\ (0,2) \\ 0,4 \\ 0,8 \\ 1,2 \\ 0,12 \\ $	$0,2 \\ (9) \\ 0,2 \\ (1) \\ 0,4 \\ (0,2) \\ 0,4 \\ 0,3 \\ 0,8 \\ 0,8 \\ 0,8 \\ 0,8 \\ 0,8 \\ 0,2 \\ 0,$	$0,3 \\ (7) \\ 1,0 \\ (6) \\ 0,9 \\ (0,1) \\ 0,6 \\ 2,0 \\ 1,8 \\ 0,5 \\ 1,8 \\ 0,5 \\ 0,7 \\ 0,7 \\ 0,6 \\ 0,7 \\ 0,$	$0,3 \\ (7) \\ 0,8 \\ (1) \\ 1,9 \\ (0,1) \\ 0,6 \\ 1,6 \\ 3,8 \\ 0,5 \\ 0,6 \\ 0,$	$0,2 \\ (7) \\ 0,2 \\ (1) \\ 0,4 \\ (0,03) \\ 0,4 \\ 0,4 \\ 0,7 \\ 0$	

Tabela 18. Incertezas combinada e expandida calculadas para as quatro fontes principais de incerteza associadas à medição da concentração das  $\beta$ -carbolinas.

C1: HOL (4,15 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (1,8 ng g<sup>-1</sup>), HAE (2,2 ng g<sup>-1</sup>), NOR (3,9 ng g<sup>-1</sup>), HIE (4,4 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (2,1 ng g<sup>-1</sup>). C4: HOL (19,8 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (19,9 ng g<sup>-1</sup>), HAE (14,5 ng g<sup>-1</sup>), NOR (16,7 ng g<sup>-1</sup>), HIE (105,4 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (21,3 ng g<sup>-1</sup>). C7: HOL (420,7 ng g<sup>-1</sup>), HLOL (409 ng g<sup>-1</sup>), HAE (181,4 ng g<sup>-1</sup>), NOR (833 ng g<sup>-1</sup>), HIE (1695,8 ng g<sup>-1</sup>) e HLINE (1277 ng g<sup>-1</sup>). A Figura 40 (HOL), Figura 41 (HLOL), Figura 42 (HAE), Figura 43 (NOR), Figura 44 (HIE) e Figura 45 (HLINE) mostram graficamente as contribuições das quatro fontes de incertezas, identificadas no diagrama de causa e efeito, para cada uma dos seis alcaloides estudados, nos três níveis de concentração, C1 (A), C4 (B) e C7 (C). Para todos os alcaloides, a contribuição da incerteza associada ao preparo da solução, *u*<sub>sol</sub>, foi a que menos contribui no valor de incerteza combinada.



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



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



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



Figura 43. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração da NOR 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).



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).



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).

A partir dos resultados, algumas observações podem ser feitas. A maior contribuição associada à medida de concentração para o nível C1 dos alcaloides HLOL e HLINE foi o preparo da solução,  $u_{sol}$ . Para HOL a  $u_c$  sofreu tanto a contribuição da  $u_{sol}$  quanto da  $u_r$ . Para NOR e HIE, ainda nesse nível de concentração, a  $u_{curva}$  e a  $u_r$  contribuíram mais que a  $u_{sol}$ . Além da  $u_r$ , todas as outras incertezas foram bastante significativas para HAE.

A incerteza associada à curva analítica agregou maior incerteza à medida da concentração de C4 para todos os alcaloides. Para HOL, HLOL, HAE e HLINE os valores de  $u_{pi}$  e  $u_r$  foram baixos, mas para HAE, NOR e HIE o valor de  $u_r$  foi significativo.

Já o nível C7, a repetibilidade para os alcaloides HOL, HLOL, HAE e HIE apresentou a maior contribuição para incerteza combinada. Diferente dos demais alcaloides, a  $u_{curva}$  foi o componente que mais agregou incerteza na  $u_c$  no último nível de concentração para NOR e HLINE.

#### 4.5 Estudos de interferência

Nos estudos de interferência se avaliou a seletividade do método proposto, ou seja, a extensão na qual o método determina um analito em uma mistura ou em uma matriz sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante (MAPA, 2011). O teste foi feito variando-se a proporção entre os analitos presentes até que não fosse mais possível determinar um analito na presença de outro. A avaliação da seletividade utilizando a equação de recuperação (Equação 42).

Na Tabela 19 são apresentados os valores de concentração, em ng g<sup>-1</sup>, das  $\beta$ carbolinas, cobrindo a faixa linear de resposta de cada uma delas (o primeiro ponto é o LOQ de cada alcaloide).

	β-carbolinas						
-	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE	
	4,1	1,8	2,2	3,9	4,4	2,1	
	9,9	10,0	5,4	167,6	10,6	10,7	
Concentração	15,8	16,0	9,1	8,4	16,9	17,1	
$(n_{\alpha}, \alpha^{-1})$	19,7	20,0	14,5	13,4	21,1	21,3	
(ng g)	98,7	99,8	18,2	16,8	105,7	106,7	
	158,0	159,6	90,8	83,8	211,5	213,5	
	197,5	199,5	145,3	838,0	1057,4	1067,5	

Tabela 19. Valores de concentração, em ng g<sup>-1</sup>, das  $\beta$ -carbolinas utilizadas para a combinação das soluções para os testes de interferência.

As proporções dos alcaloides nas misturas usadas no estudo de interferência e a ordem aleatória de análise foram definidas com auxílio do *software* Excel. Para tal, foram geradas 24 misturas de diferentes concentrações de cada analito, que estão apresentadas na Tabela 20, e cada solução foi analisada em triplicata (soluções 1 a 24) em ordem aleatória. Posteriormente, mais quatro misturas foram definidas com o objetivo de complementar a matriz, com combinações de concentrações que se julgou necessário incluir no estudo (soluções 25 a 28). As proporções entre os pares dos alcaloides mais críticos, aqueles com menor resolução (HOL/HLOL, HAE/NOR, NOR/HIE e

HIE/HLINE), nessas quatro soluções foram escolhidas de modo a se ter uma maior concentração de um dos analito em relação ao outro do par ou uma relação com as menores concentrações de ambos os alcaloides do par. As proporções, em concentração para cada um desses pares de analitos com menor resolução, nas misturas também são indicadas na Tabela 20. Vale salientar que como a diferença entre os tempos de retenção do HLOL e do HAE foi de 5 min, interferências mútuas com esse par não foi considerada provável, logo nenhuma solução teve a composição desses dois alcaloides ajustada intencionalmente.

Com relação à indicação de proporções, deve se tomar cuidado ao analisar a relação entre os pares, pois o valor da razão não revela a magnitude da concentração dos analitos na mistura, lembrando que a interferência de um analito sobre o outro pode ser diferente em proporções iguais. Por exemplo, se a proporção entre dois analitos for igual a 1:1, tal informação não indica se as concentrações dos alcaloides são elevadas ou baixas.

Número	Concentração das β-carbolinas (ng g <sup>-1</sup> )			Razão de concentração entre os alcaloides						
das soluções	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE	HOL:HLOL	HAE:NOR	NOR:HIE	HIE:HLINE
1	197,5	159,6	0,0	16,8	10,6	17,1	1:0,8	0:16,8	1:0,63	1:1,6
2	0,0	159,6	5,4	16,8	1057,4	213,5	0:160	1:3,1	1:63	1:0,2
3	0,0	99,8	5,4	8,4	21,1	10,7	0:100	1:1,53	1:2,5	1:0,5
4	4,2	16,0	14,5	167,6	211,5	21,3	1:3,8	1:11,5	1:1,3	1:0,1
5	98,7	199,5	90,8	0,0	105,7	10,7	1:2	90,8:0	0:105,7	1:0,1
6	0,0	199,5	2,1	83,8	10,6	106,7	0:200	1:39,1	1:0,13	1:10,1
7	0,0	1,8	9,1	16,8	1057,4	21,3	0:1,8	1:1,85	1:63	1:0,02
8	19,7	0,0	2,1	8,4	105,7	1067,5	19,7:0	1:3,9	1:12,6	1:10,1
9	19,7	16,0	0,0	838,0	4,4	213,5	1:0,8	16:0	1:0,005	1:48,8
10	98,7	1,8	2,1	3,9	4,4	2,1	1:0,2	1:1,8	1:1,1	1:0,47
11	197,5	20,0	9,1	0,0	1057,4	2,1	1:0,1	9,1:0	0:1057	1:0,002
12	0,0	16,0	18,2	838,0	21,1	17,1	0:16	1:46,1	1:0,25	1:0,8
13	19,7	10,0	90,8	13,4	0,0	2,1	1:0,5	1:0,15	13,4:0	0:2,1
14	197,5	1,8	90,8	167,6	105,7	1067,5	1:0,009	1:1,85	1:0,63	1:10,1
15	158,0	10,0	18,2	838,0	211,5	0,0	1:0,06	1:46,1	1:0,25	211,5:0
16	9,9	0,0	145,3	3,9	211,5	10,7	9,9:0	1:0,03	1:54	1:0,05
17	9,9	99,8	145,3	13,4	16,9	0,0	1:10	1:0,09	1:1,3	16,9:0
18	98,7	10,0	9,1	13,4	10,6	213,5	1:2	1:1,47	1:0,79	1:20,2
19	158,0	0,0	18,2	167,6	16,9	21,3	158:0	1:9,2	1:0,1	1:1,26
20	9,9	20,0	5,4	83,8	21,1	0,0	1:2	1:15,4	1:0,25	21,1:0
21	4,2	99,8	145,3	83,8	0,0	106,7	1:23,6	1:0,58	83,8:0	0:106,7
22	98,7	199,5	14,5	8,4	0,0	1067,5	1:2	1:0,58	8,4:0	0:1067,5
23	4,2	159,6	14,5	0,0	4,4	17,1	1:37,8	14,5:0	0:4,4	1:3,9
24	158,0	20,0	0,0	3,9	16,9	106,7	1:0,13	0:3,9	1:1,3	1:6,3
25	4,2	199,5	145,3	838,0	1057,4	1067,5	1:47,2	1:5,8	1:0,8	1:1
26	4,2	1,8	145,3	0,0	4,4	1067,5	1:0,43	145,3:0	0:4,4	1:243,8
27	197,5	199,5	2,1	838,0	0,0	0,0	1:1	1:391,1	838:0	-
28	0,0	199,5	0,0	3,9	1057,4	0,0	0:199,5	199,5:0	1:269,6	1057,4:0

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.

A quantificação dos analitos, em ng  $g^{-1}$ , foi feita utilizando as equações das retas para as curva analíticas (Tabela 17) conforme as faixas de concentração: completa (para concentrações superiores) e reduzida (para concentrações que pertencem à faixa de trabalho reduzida). A partir das concentrações, foram calculadas as recuperações, com base na Equação 42.

Os resultados de recuperação entre 80 e 120% foram considerados satisfatórios para o nível de concentração da ordem de ng g<sup>-1</sup> (MAPA, 2011; Ribani, 2004). Os resultados das recuperações dos analitos pertencentes aos pares críticos foram graficados (Figura 46, Figura 47, Figura 48 e Figura 49). Nos gráficos, as linhas pontilhadas representam o limite inferior de 80% e o limite superior de 120% de recuperação e os pontos representam os valores das recuperações percentuais dos analitos. No caso das recuperações de analitos fora da faixa delimitada pela linha pontilhada não se pode quantificá-los com a confiança estabelecida para o teste, devido à interferência imposta por outro analito presente na amostra num nível de concentração específico.

Na Figura 46 podem ser observadas as recuperações alcançadas para o par HOL/HLOL nas 28 misturas testadas, levando-se em conta a proporção HOL:HLOL.



Figura 46. Recuperações obtidas para o par de analitos ( $\blacksquare$ ) HOL/( $\Box$ ) HLOL. Linhas pontilhadas (----): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

As recuperações para HOL nas soluções 17 (1:10), 21 (1:23,6), 23 (1:37,8) e 25 (1:47,2) ficaram acima do limite superior de 120%. Isso significa que só seria possível quantificar HOL na presença de HLOL em misturas que tivessem a proporção entre esses dois analitos abaixo de 1:10, que nesse caso a concentração de

HOL e HLOL eram iguais a, respectivamente, 9,9 e 99,8 ng g<sup>-1</sup>. A mistura 4, de razão 1:3,8 seria a primeira proporção abaixo de 1:10 que aponta resultado dentro do limite aceitável de recuperação. Portanto, quando a concentração de HOL é no máximo 4 vezes menor que a do HLOL é possível quantificá-lo sem interferência. Por outro lado, é possível observar que quando o HOL está em quantidades iguais ou superiores ao HLOL a recuperação encontra-se dentro da faixa de 80 a 120%. Isso pode ser observado no resultado obtido com a solução 27 (proporção 1:1) que tem o máximo de HLOL, em concentração, dentro da faixa estabelecida (Tabela 20), ou seja, concentração de HOL de 197,5 ng g<sup>-1</sup> e concentração máxima de HLOL do teste (199,5 ng g<sup>-1</sup>). Com relação ao HLOL, a análise de todas as soluções produziram recuperações dentro da faixa limite, inclusive a solução de número 14, onde o HLOL (1,8 ng g<sup>-1</sup>) estava presente em concentração 110 vezes menor do que o HOL (197,5 ng g<sup>-1</sup>). Uma comparação, com base numa situação real do trabalho desenvolvido por Abourashed et al. (2003) onde foram analisados 104 espécies de Passiflora, a maior proporção encontrada entre HOL e HLOL foi de 1:0,2 (230 ng g<sup>-1</sup> de HOL para 50 ng  $g^{-1}$  de HLOL). Considerando a presença de cinco vezes maior de HOL em relação ao HLOL nessa amostra, conclui-se que a determinação desse par de alcaloides em amostras pelo método proposto por MLC pode ser realizada sem interferência significativa.

Na Figura 47 estão relacionadas as recuperações para o par HAE/NOR nas 28 soluções. Pelos cromatogramas já foi possível observar que esse par é o de menor resolução dentre todos os estudados. Portanto, esperavam-se faixa de concentrações relativas muito restrita para a qual não se observaria interferência.



Figura 47. Recuperações obtidas para o par de analitos ( $\Box$ ) HAE/( $\blacksquare$ ) NOR. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

Levando-se em conta as diferentes proporções HAE:NOR, para a NOR as soluções que ficaram fora da faixa limite foram as de números 12 e 15 (1:46,1), 6 (1:39,1), 25 (1:5,8), 8 (1:3,9), 14 (1:1,85), 18 (1:1,47) e 16 (1:0,03). As soluções que possuem razão de 1:9,2 (solução 19) e 1:15,4 (solução 20) apresentaram recuperações de NOR satisfatórias. Comparando as concentrações de HAE e NOR nas soluções 25 (145,3 e 838 ng g<sup>-1</sup>) e 20 (5,4 e 83,8 ng g<sup>-1</sup>) pode se concluir que o resultado insatisfatório para a solução 25 advém da elevada concentração dos analitos, o que acarreta em maior largura dos picos e, consequentemente, uma maior interferência na medida da integração das áreas.

Outro caso foi o par de soluções (10 e 14) de mesma proporção (1:1,8), onde a recuperação na solução 10 está dentro dos limites e a da solução 14 está fora da faixa de 80 a 120%. Essa discrepância é explicada em função das concentrações das soluções. A solução 10 está numa faixa de baixa concentração para HAE (2,1 ng g<sup>-1</sup>) e para NOR (3,9 ng g<sup>-1</sup>), enquanto que a 14 está numa faixa mais elevada para ambos os analitos (90,8 e 167,6 ng g<sup>-1</sup> para HAE e NOR, respectivamente). Consequentemente, os picos ficaram mais próximos na mistura 14 de modo que houve interferência mutua (recuperação de 297% para NOR e 15% para HAE) na integração das áreas. Fato similar ocorreu com as misturas 4 (1:11,5) e 25 (1:5,8), que apesar da maior proporção entre os analitos, a mistura 4 não indicou interferência enquanto que na solução 25 a interferência foi observada. Esse resultado é consequência dos diferentes níveis de concentração dos analitos presentes na solução 4 (14,5 para HAE e 167,4 ng g<sup>-1</sup> para NOR) em relação a solução 25 (145,3 para

HAE e 838 ng g<sup>-1</sup> para NOR). Na mistura 16 houve uma diferença de 37 vezes entre a concentração HAE e da NOR, e não foi possível observar o pico da NOR, porém na mistura 17 (1:0,09) as recuperações para HAE e NOR ficaram dentro da faixa aceitável.

Com relação ao HAE, interferências foram observadas nas soluções 12, 14, 15, 18, 21 e 25, praticamente as mesmas em que não se observou interferência para a NOR, exceto as soluções 6, 16 e 21. Nas misturas 21 e 22, que têm a mesma proporção dos analitos (1:0,58), os resultados foram opostos. A solução 21 (145,3 ng  $g^{-1}$  para HAE e 83,8 ng  $g^{-1}$  para NOR) se observou interferência para HAE, enquanto que na solução 22, que possui um nível de concentração menor (14,5 ng  $g^{-1}$  para HAE e 8,4 ng  $g^{-1}$  para NOR), nenhuma interferência foi observada na recuperação de ambos. Com base nos resultados encontrados, as razões limites entre HAE/NOR para a quantificação da NOR seria entre 1:15,4 e 1:0,09. Para HAE, como conclusão preliminar, o limite é obtido na mistura 21, que possui elevada concentração do par, sendo que a recuperação desse analito em pequenas concentrações ficou dentro da faixa de 80 a 120%.

Na Figura 48 são apresentadas as recuperações para o par NOR/HIE nas 28 soluções. Como esperado, as soluções que apresentaram recuperação fora da faixa aceitável para NOR em relação ao HIE foram as mesmas em que houve interferência para o par HAE/NOR (soluções 6, 8, 12, 14, 15, 16, 18, 25), uma vez que já foi identificada uma interferência imposta pela HAE na área medida para a NOR. Como o pico cromatográfico da NOR se situa entre HAE e HIE, deveria se esperar que algumas soluções para NOR sofresse interferências em função da presença dos dois analitos. Porém, a NOR aparentemente sofre uma interferência muito mais significativa da presença de HAE do que de HIE, pois a diferença entre os tempos de retenção do par HAE/NOR é menor que a diferença entre NOR/HIE.



Figura 48. Recuperações obtidas para o par de analitos (■) NOR/(□) HIE. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

Para a HIE, a solução 18 (1:0,79) e a solução 26 (0:4,4) apresentaram recuperação fora da faixa adotada como aceitável. Estima-se que a quantificação do HIE recebe uma maior interferência do HLINE do que da NOR, pois nestas soluções, a concentração da NOR é relativamente baixa ou inexistente quando comparada a concentração de HLINE.

Na Figura 49 são mostradas as recuperações em relação ao par HIE/HLINE. Visualmente, observa-se que todas as razões entre HIE e HLINE encontram-se dentro da faixa de aceitação, isto significa que HIE não é um interferente para HLINE, nas proporções avaliadas, que vão de 1:0,002 (mistura 11) até 1:243,8 (mistura 26).



Figura 49. Recuperações obtidas para o par de analitos (□) HIE/(■) HLINE. Linhas pontilhadas (---): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

Como mencionado, HLINE influencia na quantificação de HIE e as misturas que apresentaram recuperações fora da faixa aceitável para HIE são as mesmas rejeitadas para o par NOR/HIE (soluções 18 e 26). A interferência observada para a solução 18 (1:20,2) pode ser atribuída a uma falha na preparação da solução, pois há proporções muito mais significativas, como a mistura 9 (1:48,8) que ficaram dentro do limite de 80 a 120%, e por isso, o resultado dessa solução foi considerado discrepante. Já a solução 26 (1:243,8) justifica pela razão entre HIE/HLINE ser tão alta e HIE ter sofrido interferência do HLINE.

# 4.4 Comparação entre Métodos e Ensaios de Recuperação

Para comparar o desempenho do método proposto para a quantificação das  $\beta$ carbolinas por MLC foi utilizado o método de autoria de Cheng e Mitchelson (1997) que propôs a quantificação dos seis alcaloides por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). No trabalho, os autores descreveram as condições experimentais para a separação das seis β-carbolinas (HOL, HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE) por MEKC usando o surfactante aniônico SDS, como pseudofase estacionária, e detecção absorciométrica no UV-vis. O trabalho foi escolhido em função de envolver os alcaloides que foram estudados nesta Tese, além do fato do método utilizar o mesmo surfactante aniônico que é utilizado no método proposto por MLC. Adicionalmente, a técnica MEKC faz parte do escopo das estudadas no LEEA-PUC-Rio, onde foi desenvolvido esse trabalho, o que facilitou a reprodução do método. Uma desvantagem na escolha do método de comparação foi que a faixa de trabalho utilizada por MEKC (1 x 10<sup>-5</sup> a 1 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) é muito superior a faixa do método proposto por MLC (1 x 10<sup>-8</sup> a 1 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>). Outra opção do método de comparação seria o desenvolvido por Cepas et al. (1996), que tecnicamente não foi possível reproduzir no laboratório pela complexidade da derivatização química envolvida e que utiliza o reagente bis(2,4-dinitrofenil)oxalato.

A fim de melhorar a eficiência de separação dos analitos, as condições experimentais do método por MEKC foram reproduzidas com algumas modificações propostas por Marques et al. (2008), como a retirada da ureia, que provocava a quebra

frequente do capilar. Segundo Marques, as condições reportadas no trabalho de Cheng e Mitchelson (1997) não eram robustas para a separação com variações no tempo de migração e na área dos picos dos analitos. Marques et al. (2008) determinou, pelo método MEKC modificado, os alcaloides HOL, HAE, NOR, HIE e HLINE. Como o HLOL não foi determinado por esse método, esse alcaloide também não foi incluído no estudo de comparação com o método por MLC. Nas condições experimentais adaptadas, a separação foi feita em um tempo de migração total de 18 min.

Na Tabela 21 são mostradas as condições experimentais utilizadas na construção da curva analítica para HOL, NOR, HAE, HIE e HLINE, pela metodologia por MEKC.

Tabela 21. Condições experimentais adaptadas utilizadas no estudo comparativo com o método de referência baseado em MEKC para a quantificação das seis  $\beta$ -carbolinas.

Condições experimentais						
Dimensões do capilar	60 cm total (52 cm até o detector) e 75 µm de diâmetro interno.					
Temperatura	25°C					
Voltagem	25 Kv					
Tempo de injeção	75 s					
BGE (eletrólito de corrida)	SDS (50 mmol L <sup>-1</sup> ), ácido bórico (0,4 mol L <sup>-1</sup> ), ACN (15% v/v) e ajuste de pH 9,0 com solução de NaOH (1 mol L <sup>-1</sup> ).					
Soluções	Diluídas em 75:25 v/v (tampão borato 20 mmol L <sup>-1</sup> pH 9,0 e água ultrapurificada).					

Na Figura 50 é apresentado o eletroferograma resultante da introdução de uma mistura dos alcaloides, HOL, NOR, HAE, HIE e HLINE utilizando a técnica de MEKC nas condições experimentais da Tabela 21, onde se pode observar uma boa resolução na separação entre os picos e na eficiência dos picos. Todas as  $\beta$ -carbolinas foram detectadas em  $\lambda = 241$  nm, exceto HLINE, em  $\lambda = 383$  nm.



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 x 10<sup>4</sup> ng g<sup>-1</sup>, t<sub>m</sub> = 7,8 min), NOR (1,7 x 10<sup>4</sup> ng g<sup>-1</sup>, t<sub>m</sub> = 9,8 min), HAE (9 x 10<sup>3</sup> ng g<sup>-1</sup>, t<sub>m</sub> = 11,2 min), HIE (2 x 10<sup>4</sup> ng g<sup>-1</sup>, t<sub>m</sub> = 12,7 min) e HLINE (2 x 10<sup>4</sup> ng g<sup>-1</sup>, t<sub>m</sub> = 16,6 min).

A construção da curva analítica para a quantificação dos alcaloides por MEKC foi realizada em quatro pontos de concentração, em mol L<sup>-1</sup>, e cada nível de concentração foi preparado em duas réplicas autênticas. Na Tabela 22, os valores de concentrações estão convertidos para ng g<sup>-1</sup> para facilitar a comparação entre o método por MEKC com e o proposto que se baseia no MLC. Portanto, as curvas analíticas foram construídas em termos de concentrações em ng g<sup>-1</sup> em função das áreas, em unidade arbitrária, correspondentes para cada um dos alcaloides. Utilizando o método dos mínimos quadrados foi realizada a regressão linear e obtida a equação da reta e o valor de R<sup>2</sup>. Todas as regressões lineares obtiveram R<sup>2</sup> próximo de 1. As equações da reta e seus respectivos valores de R<sup>2</sup> são apresentados na Tabela 23.

Tabela 22. Faixas de concentração das  $\beta$ -carbolinas, em ng g<sup>-1</sup>, utilizadas na construção da curva analítica dos alcaloides no procedimento de determinação por MEKC.

Soluções de		Cor	centração x 10 <sup>3</sup>	(ng g <sup>-1</sup> )	
β-carbolinas	HOL	NOR	HAE	HIE	HLINE
C1	2,0	1,6	2,0	2,0	2,2
C2	9,8	8,4	9,1	10,5	9,9
C3	19,5	16,7	18,1	16,8	17,1
C4	38,9	33,4	39,4	21,0	19,8

β-carbolinas	Equação da reta	$R^2$
HOL	y = 21,38x - 7,37	0,9997
NOR	y = 41,48x - 31,25	0,9979
HAE	y = 37,01x - 34,61	0,9982
HIE	y = 36,49x - 9,72	0,9975
HLINE	y = 29,05x - 18,90	0,9976

Tabela 23. Equações da reta e valores de  $R^2$  para as curvas analíticas construídas por MEKC para a série de  $\beta$ -carbolinas.

Para comparar os métodos se selecionou um voluntário (não fumante e sem o hábito de ingestão de bebidas alcoólicas) para doação da amostra de urina de modo a se minimizar a chance da presença de alcaloides  $\beta$ -carbolinas na amostra, já que sua presença está associada ao fumo e à ingestão de bebidas alcoólicas (Adachi et al., 1991; Pfau e Skog, 2004; Herraiz, 2004; Tsuchiya, 2004).

A amostra de urina do voluntário não fumante foi fortificada em dois pontos de concentração, indicados como C1 e C2, que são em níveis diferentes, para análise por MLC e por MEKC, conforme a faixa de concentração de trabalho para cada método. A amostra de urina fortificada foi tratada conforme procedimentos descritos (subitem 3.4.8). Cada ponto foi preparado em três réplicas autênticas com soluções padrões independentes. Como a faixa de trabalho é diferente para cada método, as soluções estoque foram diluídas até atingir a concentração desejada. As soluções analisadas por MLC foram muito mais diluídas que as preparadas para a determinação por MEKC, assim as recuperações foram normalizadas para se proceder a comparação. Para facilitar a diluição das soluções utilizadas por MLC foram preparadas soluções intermediárias a partir da solução estoque. Na Tabela 24 são mostrados os valores de concentração, ng g<sup>-1</sup>, para os dois níveis C1 e C2 correspondente a cada analito em duas réplicas. Os valores apresentados entre parênteses são os fatores de diluição da solução estoque que foram utilizados para atingir a concentração desejada.

	Concentração (ng g <sup>-1</sup> )						
β-carbolina –	MI	LC	MEKC (x 10 <sup>3</sup> )				
	$C_1$ (fator de diluição)		C <sub>1</sub> (fator de diluição)	C <sub>2</sub> (fator de diluição)			
HOL	39,5 (49347,3)	197,5 (9869,5)	9,9 (196,9)	20,0 (97,5)			
HLOL	39,9 (51505,6)	199,5 (10301)	-	-			
HAE	36,3 (50018,3)	181,6 (9998,2)	9,1 (199,5)	18,2 (99,8)			
NOR	33,5 (50028,9)	167,6 (9999,8)	8,4 (199,5)	16,8 (99,8)			
HIE	42,3 (49597,3)	211,5 (9919,5)	10,6 (197,9)	16,9 (124,2)			
HLINE	42,7 (49298)	213,5 (9859,6)	10,7 (196,73)	17,1 (123,1)			

Tabela 24. Valores de concentrações, em 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.

Na Figura 51 foram superpostos os eletroferogramas obtidos por MEKC de amostras de urina não fortificadas (B), considerada como ensaio em branco, e a mesma amostra de urina após fortificação (A) com os cinco alcaloides, HOL, HAE, NOR, HIE e HLINE.



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 HILNE, em  $\lambda = 383$  nm.

Os cromatogramas obtidos, utilizando a técnica por MLC, pela injeção da amostra de urina do voluntário não fumante (ensaio em branco) (A) e a injeção da urina fortificada (B) com os seis alcaloides são apresentados na Figura 52.



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.

Três réplicas autênticas das soluções nos níveis de concentração C1 e C2 foram preparadas e determinadas por MLC e por MEKC. Como as faixas de trabalho dos métodos proposto e de referência são diferentes, fez-se necessário comparar a razão entre a concentração recuperada e concentração esperada. Desta forma, o resultado das medidas das concentrações em ambos os métodos seriam normalizados com resultados adequados aqueles próximos da unidade. Na Tabela 25 são apresentados os resultados do teste t bi-caudal, presumindo variâncias diferentes para os níveis de concentração C1 e C2, comparando MLC e MEKC. Os valores em negrito representam, respectivamente, os resultados dos testes t<sub>calculado</sub>, valor-P e t<sub>crítico</sub> para C1 e C2. Para os testes, os valores de t<sub>calculado</sub> (1,99 para C1 e 1,56 para C2) foram menores que t<sub>crítico</sub> (2,16 para C1 e 2,31 para C2), para 95% de confiança. Diante desses resultados, pode se dizer que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto por MLC e o método de comparação.

	C	l	C2		
	MLC	MEKC	MLC	MEKC	
Média	1,02	0,959	0,989	0,954	
Variância	5 x 10 <sup>-4</sup>	1,2 x 10 <sup>-2</sup>	7 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-3</sup>	
gl (grau de liberdade)	13	17	8	8	
t <sub>calculado</sub>	1,9	9	1,	56	
valor-p bi-caudal	0,00	57	0,	16	
t <sub>crítico</sub> bi-caudal	2,1	6	2,	31	

Tabela 25. Teste t bi-caudal para os níveis de concentração C1 e C2 medidas por MLC e por MEKC.

Comparando as variâncias dos resultados, apresentados na Tabela 25, o método por MLC apresentou menores desvios em relação ao método por MEKC. Desta forma, foi realizada uma comparação entre as variâncias obtidas por ambos os métodos para C1 (Tabela 26) e C2 (Tabela 27), utilizando ANOVA com fator único. Os valores em negrito representam, respectivamente, os resultados dos testes  $F_{calculado}$ ,  $F_{crítico}$  e valor-p.

Tabela 26. Valores resultantes da Análise de Variância – ANOVA: fator único, para a medida de concentração, em ng  $g^{-1}$ , para o nível de concentração C1 por MLC e por MEKC.

		С	1			
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-p	F <sub>crítico</sub>
Entre grupos	0,0377	1	0,0377			
Dentro dos grupos	0,129	27	0,00478	7,88	0,0092	4,21
Total	0,167	28				

C2							
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-p	F <sub>crítico</sub>	
Entre grupos	0,0069	1	0,00691				
Dentro dos grupos	0,039	20	0,00195	3,54	0,074	4,35	
Total	0,046	21					

Tabela 27. Valores resultantes da Análise de Variância – ANOVA: fator único, para a medida de concentração, em ng  $g^{-1}$ , para o nível de concentração C2 por MLC e por MEKC.

Com base nos resultados, o valor de  $F_{calculado}$  foi maior que o  $F_{crítico}$  e o valor-p ficou abaixo de 0,05 para o teste C1. Este resultado indica que há uma diferença significativa entre as variâncias das medidas obtidas por MLC e por MEKC. Os resultados para o 2º nível de concentração, C2, resultou em  $F_{calculado} < F_{crítico}$  e valor-p > 0,05, indicaram igualdade estatística entre as variâncias resultantes das medidas das soluções de alcaloides realizadas pelos dois métodos.

As recuperações (Equação 42) dos seis alcaloides por MLC e por MEKC foram calculadas em valor percentual, pela razão entre a média das três concentrações estimadas pelas equações da reta – correspondentes às áreas obtidas pelos cromatogramas – e a média das duas concentrações dos padrões de mesma concentração também calculadas pela equação da reta. O desvio padrão foi determinado e está apresentado na Tabela 28 com o respectivo valor da recuperação percentual.

β-carbolina	Recuperação (%)			
	MLC		МЕКС	
	$C_1$	$C_2$	$C_1$	$C_2$
HOL	$103,1\pm0,5$	$97,9\pm0,3$	$113,7\pm3,4$	81, 3 ± 1
HLOL	$98,3\pm0,2$	$99,6\pm0,2$	-	-
HAE	$101{,}5\pm0{,}4$	$99,5\pm0,5$	$83,0\pm3,6$	$90,1\pm5,\!6$
NOR	$104{,}5\pm0{,}5$	$105{,}8\pm0{,}9$	$92{,}7\pm5{,}1$	$93,2\pm5,2$
HIE	$101,8\pm0,6$	$98,1\pm0,2$	$90{,}8\pm4{,}9$	$100, 5 \pm 5,3$
HLINE	$103,4 \pm 0,2$	$99,7\pm0,2$	$91,5 \pm 7,6$	$91,9\pm5,9$

Tabela 28. Valores de recuperação, em %, para os dois níveis de concentração C1 e C2, em ng g<sup>-1</sup>, obtidos pelo método proposto por MLC e pelo método de referência por MEKC em amostra de urina fortificada.

Os valores de recuperação obtidos, quantificados em ambos os métodos, para todos os seis alcaloides, em amostra de urina, ficaram dentro da faixa de recuperação aceitável de 80 a 120%, sendo que para o método proposto por MLC essa faixa foi de 97,9 a 105,8 %. O maior desvio resultante da medida da recuperação foi igual a 0,9%.

# 4.5 Aplicação do método proposto por MLC

O método proposto baseado na técnica de MLC foi aplicado na análise de urina de voluntários, em amostras de *Passiflora incarnata* e amostra de *Passiflora alata* de modo a avaliar se o método era capaz de determinar quantidades dos analitos realmente esperados para as amostras reais.

## 4.5.1 Urina de Fumantes

As  $\beta$ -carbolinas são consideradas biomarcadores em pessoas que abusam da ingestão de bebidas alcoólicas e de cigarros. Com isso há trabalhos na literatura que investigam a presença dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos em amostras de cabelo de fumantes e de alcoólatras, em urina de fumantes, em bebidas alcoólicas, em fumaça de cigarro, dentre outras amostras relacionadas (Adachi et al., 1991; Pfau e Skog, 2004; Herraiz, 2004; Tsuchiya, 2004). Esses estudos motivaram a investigação qualitativa e quantitativa da presença dos alcaloides em urina de fumantes. Dessa forma, foram coletadas amostras de urina de três voluntários fumantes entre 30 e 50 anos, sendo dois do sexo masculino e um do sexo feminino. As amostras de urina dos fumantes foram tratadas, conforme procedimento descrito no subitem 3.4.8. A seguir, as amostras tratadas foram diluídas em fase móvel micelar para posteriormente serem analisadas por MLC.

De acordo com os resultados obtidos, não foi encontrado nenhum pico correspondente às  $\beta$ -carbolinas nas amostras de urina dos fumantes dos três voluntários, como pode ser observado na Figura 53.



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.

## 4.5.2 Passiflora incarnata e alata

Para a identificação e quantificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos presentes em *P. incarnata* e *P. alata* foram utilizadas diferentes fontes dessas plantas. A aplicação do método baseado no MLC em *Passiflora incarnata* foi realizada com as seguintes amostras: medicamento fitoterápico de Maracujá, urina de voluntário coletada após a administração de dois comprimidos do medicamento fitoterápico e tintura de *P. incarnata*. Para a *Passiflora alata* foram utilizadas amostras de chá misto de Maracujá – *Passion Fruit*. Todas as amostras foram adquiridas no comércio local.

## 4.5.3 Medicamento fitoterápico de *Passiflora incarnata* L.

O medicamento fitoterápico foi utilizado na forma de comprimidos revestidos do extrato seco das partes aéreas de *Passiflora incarnata*. Segundo a bula, cada comprimido continha 320 mg do extrato seco, sendo que 8 mg era equivalente a flavonóides totais calculados como vitexina. Segundo o fabricante, as partes aéreas da *Passiflora incarnata* contêm pelo menos 1,5% de flavonóides totais expressos em vitexina e isovitexina. A presença e/ou a quantidade dos alcaloides  $\beta$ -carbolinas não foram citados na bula do medicamento. Este fitoterápico é indicado para o tratamento de insônia, irritabilidade, agitação nervosa e desordens da ansiedade, uma vez que atua no sistema nervoso central produzindo efeito sedativo, prolongando o período de sono.

A posologia indicada pelo fabricante do medicamento fitoterápico é a ingestão de dois comprimidos, por via oral, três vezes ao dia, de oito em oito horas. Desta forma, foram utilizados dois comprimidos, de massa total igual a 1,3001 g, para a identificação dos alcaloides. Os comprimidos foram pesados, macerados e dissolvidos em metanol, conforme a descrição no subitem 3.4.9.

Para a identificação dos picos originais dos alcaloides presente no medicamento fitoterápico, fortificou-se a amostra com a solução padrão dos alcaloides  $\beta$ -carbolinas nas seguintes concentrações, em ng g<sup>-1</sup>, HOL (19,77), HLOL (14,96), HAE (18,14), NOR (21,79), HIE (18,61) e HLINE (21,31) e preparou-se a amostra fortificada seguindo o mesmo procedimento para a solução amostra. Na Figura 47 foram superpostos os cromatogramas obtidos pela injeção da solução amostra (A) e da solução amostra fortificada (B). Os cromatogramas foram editados de forma que os picos referentes aos alcaloides ficassem em evidência. Desta forma, os picos iniciais relativos aos outros componentes da matriz foram cortados. No cromatograma da solução amostra é possível observar a presença de dois picos de tempo de retenção igual a 11,5 min e 22,5 min, coincidentes com os tempos de retenção do HOL e do HIE. Para confirmar a presença dos alcaloides, foi analisada amostra de medicamento fortificada com uma solução padrão dos analitos e os

tempos de retenção comparados. Observou-se o aumento da intensidade do sinal do pico relativo ao HOL, sendo possível afirmar a sua presença no medicamento fitoterápico. Além do HOL, o alcaloide HIE também foi identificado na amostra, porém em quantidade bem inferior ao HOL, como pode ser observado no detalhe (aumento da região do HIE) da Figura 54. Não foram identificados os demais alcaloides HLOL, HAE, NOR, HIE e HLINE.



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.

#### 4.5.4

#### Urina de voluntário após a administração de medicamento fitoterápico

A fim de estudar a excreção, via urina, dos alcaloides após a administração de uma dosagem do medicamento fitoterápico de Maracujá, um voluntário não-fumante e saudável, ingeriu dois comprimidos do medicamento. A fim de determinar a quantidade de HOL excretado pelo usuário do medicamento fitoterápico, optou-se por coletar a amostra de urina em até 8 h, seguindo as orientações da posologia indicada pelo fabricante. Desta forma, 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 foram tratadas, logo após a coleta, seguindo o procedimento de *clean up*, descrito no subitem 3.4.8. A seguir, 2,00 mL dessas amostras tratadas foram diluídas em 5,00 mL para posteriormente serem analisadas por MLC. Na Figura 55 são mostrados os cromatogramas resultantes das análises das amostras nos tempos 0 h (A), 1 h (B), 2 h (C) e 8 h (D). Pode-se observar que apenas a amostra de urina coletada 8 h após a ingestão dos comprimidos apresentou um pico cromatográfico com tempo de retenção igual a 11,5 min.



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.

Para a identificação do analito referente ao pico cromatográfico, a amostra de urina de 8 h foi fortificada com uma solução padrão dos alcaloides  $\beta$ -carbolinas nas seguintes concentrações, em ng g<sup>-1</sup>, HOL (19,77), HLOL (14,96), HAE (18,14), NOR (21,79), HIE (18,61) e HLINE (21,31). Na Figura 56 são comparados os cromatogramas da urina após 8 h da administração do medicamento (A) e da mesma amostra de urina fortificada com soluções-padrão dos alcaloides (B). Os resultados permitiram identificar o alcaloide HOL presente na urina.



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.

# 4.5.5 Tintura de Passiflora incarnata

A tintura de *P. incarnata* é uma solução alcoólica resultante da extração das folhas secas maceradas da planta. Segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2011), cada 10 mL da tintura corresponde a 1 g da planta seca. A posologia indicada é a administração de uma dosagem entre 20 e 30 gotas da tintura, três vezes ao dia. A ANVISA recomenda o uso da tintura de *Passiflora* apenas em pessoas acima de 12 anos com dosagem de 2,5 a 5,0 mL diluídos em 75 mL de água, três vezes ao dia para a obtenção de efeitos ansiolíticos. Como sedativo leve, o órgão federal recomenda diluir 5 mL da tintura em 75 mL e tomar 1 h antes de deitar.

Para a determinação dos alcaloides beta-carbolínicos presentes na tintura nas dosagens mínima (20 gotas) e máxima (30 gotas) recomendadas pelo fabricante, preparou-se duas soluções amostras, respeitando a quantidade de tintura recomendada em cada dosagem, conforme a metodologia descrita no item 3.4.9. Para a identificação dos possíveis alcaloides presentes na amostra de tintura, fez-se uso da

fortificação com os alcaloides  $\beta$ -carbolinas nas seguintes concentrações, em ng g<sup>-1</sup>, HOL (19,77), HLOL (14,96), HAE (18,14), NOR (21,79), HIE (18,61) e HLINE (21,31). Na Figura 57 são mostrados três cromatogramas resultantes das injeções das dosagens de 20 gotas (A), de 30 gotas (B) e da amostra de 30 gotas de tintura fortificada com uma solução padrão dos alcaloides. Pode-se observar que a tintura, em ambas as dosagens, apresentou apenas um pico cromatográfico, com o tempo de retenção igual a 11,2 min, referente ao HOL, que teve sua intensidade aumentada pela fortificação com a solução padrão. Assim, foi possível identificar a presença desse alcaloide na tintura de *P. incarnata*.



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.

## 4.5.6

## Chá Misto de Maracujá – Passiflora alata Dryander

Para a identificação da possível presença de alcaloides na *Passiflora alata* foi utilizado amostra de chá misto de Maracujá, que continha em sua composição: Maracujá (*P. alata Dryander*), Maçã (*Pyrus malus L.*), Flor de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa L.*), folha de mate tostado (*Ilex paraguaiensis*) e aroma idêntico ao natural

de Maracujá. Para o preparo de uma xícara de 200 mL de chá, o fabricante recomenda a infusão de um sachê de 1,5 g em água quente.

Para a identificação da presença de possíveis alcaloides  $\beta$ -carbolínicos foi utilizado o extrato seco de dois sachês, com massa igual a 2,9987 g. O extrato do chá foi tratado conforme a metodologia descrita no subitem 3.4.9. Como a quantidade de alcaloide presente na amostra de chá estava abaixo do limite de quantificação do método por MLC, a solução amostra foi pré-concentrada em um fator de seis vezes, com auxílio de um vazão de nitrogênio.

A solução de amostra resultante foi então introduzida no sistema cromatógrafico e analisada usando as condições experimentais ajustadas para o método por MLC. A mesma amostra foi fortificada com a solução padrão dos alcaloides  $\beta$ -carbolinas nas seguintes concentrações, em ng g<sup>-1</sup>, HOL (19,77), HLOL (14,96), HAE (18,14), NOR (21,79), HIE (18,61) e HLINE (21,31). Pode-se observar na Figura 58 que o cromatograma do chá misto de Maracujá (A) revelou a presença de três picos cromatográficos, possivelmente de alcaloides  $\beta$ -carbolinas, com t<sub>R</sub>'s iguais a 19,5; 22,4 e 26,0 min, mostrada em dois canais de detecção, 370/447 nm e 370/495 nm. Pela fortificação dessa amostra foi confirmada a presença de NOR, HIE e HLINE. Os demais alcaloides não foram identificados. Possivelmente, os alcaloides presentes no chá são provenientes da *P. alata* Dryander.



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.

# Quantificação dos alcaloides identificados nas amostras de *P. incarnata* e *P. alata* Dryander

Para fins de quantificação, cada amostra foi injetada em triplicata e a concentração e o desvio padrão, em ng  $g^{-1}$ , foram calculados com o auxílio da equação da curva analítica do alcaloide identificado.

Para o medicamento fitoterápico a concentração do HOL na solução amostra foi igual a 75,4  $\pm$  0,4 ng g<sup>-1</sup>. Pelos cálculos de diluição, estima-se que cada comprimido tem o equivalente a 377 ng do alcaloide HOL em 320 mg do extrato seco da planta.

A concentração HOL na amostra de urina diluída após 8 h da administração de dois comprimidos foi igual a  $14,7 \pm 0,1$  ng g<sup>-1</sup>. No cálculo de concentração foi utilizada a equação da curva reduzida, pois o valor da área integrada estava dentro da faixa da curva reduzida para HOL. Pelos cálculos de diluição, estima-se que após 8 h da ingestão de uma dosagem do fitoterápico, o voluntário excretou o equivalente a 276 ng do alcaloide HOL. Esse valor de massa de HOL é 73% do valor estimado do alcaloide presente em uma dosagem do medicamento. Vale ressaltar que a posologia recomendada pelo fabricante do medicamento fitoterápico é de dois comprimidos, três vezes ao dia, de oito em oito horas. Isto significa uma ingestão de seis comprimidos ao dia. Para mais detalhes sobre o tempo de excreção, via urina, do alcaloide HOL faz se necessário um estudo mais aprofundado com a participação de um número significativo de voluntários sadios e não-fumantes, tempo de coleta superior a 8 h e normalização dos resultados com cálculo de concentração de creatinina.

Para a dosagem mínima de tintura – 20 gotas da tintura – foi encontrado um valor de  $20,6 \pm 0,2$  ng g<sup>-1</sup> de HOL (concentração calculada com auxílio da equação da reta para curva reduzida) e  $33,1 \pm 0,3$  ng g<sup>-1</sup> para a dosagem máxima – 30 gotas da tintura (utilizando a equação da curva completa). A massa estimada em 20 gotas e 30 gotas na tintura de *P. incarnata* foi de 103 e 165 ng de HOL.
No chá misto de maracujá foi identificado NOR, HIE e HLINE. Utilizando as equações das curvas analíticas para as faixas reduzidas referentes aos analitos identificados pelo cromatograma da amostra fortificada calculou-se a concentração de cada alcaloide. As concentrações encontradas foram 19,54 ng g<sup>-1</sup> para NOR e 12,9 ng g<sup>-1</sup> para HIE. O alcaloide HLINE foi apenas detectado, pois a concentração encontrada era abaixo do LOQ. A massa estimada, em ng, dos alcaloides NOR e HIE em 1,5 g de extrato seco, o equivalente a um sachê, foram respectivamente, 109 ng e 72 ng.

Na Tabela 29 são mostradas as massas estimadas, em ng, dos alcaloides presentes nas amostras analisadas.

Tabela 29. Massa estimada, em ng, dos alcaloides presentes nas amostras de *Passiflora incarnata* em matrizes de medicamento fototerápico, tinturas, urina e *Passiflora alata* Dryander em matriz de chá.

Amostras	HOL	HLOL	HAE	NOR	HIE	HLINE
Urina de fumantes	nd <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	Nd
Comprimido do medicamento fitoterápico	377	nd	nd	nd	Detectado	Nd
Urina de voluntário após 8 h	276	nd	nd	nd	nd	Nd
Tintura de <i>Passiflora incarnata</i> -20 gotas	103	nd	nd	nd	nd	Nd
Tintura de <i>Passiflora incarnata</i> -30 gotas	165	nd	nd	nd	nd	Nd
Chá misto de Maracujá – P. atala Dryander – 1 sachê	nd	nd	nd	109	72	Detectado

<sup>a</sup>nd – não detectado.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1012263/CA