

## 5.

### **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida micelar para quantificação galantamina e seus quatro metabólitos principais**

#### 5.1

##### **Resultados**

##### 5.1.1

##### **Separação de galantamina e seus principais metabólitos por MLC**

Como já discutido, o sucesso da separação por MLC requer conhecimento prévio da influência do surfactante (natureza e concentração), do modificador orgânico (tipo e proporção) e do pH da fase móvel. A compreensão das características ácido-base dos analitos também é crucial para a escolha e ajuste dos parâmetros experimentais a serem usados.

O ajuste do valor do pH da fase móvel micelar tem grande influência na qualidade da separação quando os analitos podem se ionizar em meio aquoso, como é o caso da galantamina (GAL). A variação do pH altera a razão das concentrações das formas ácida e básica das substâncias, afetando o tempo de retenção, uma vez que a presença de cargas pode provocar a repulsão ou atração das espécies pela superfície das micelas de surfactantes iônicos como as de SDS (Carda-Broch et al., 2000). Além disso, dependendo da forma em que a espécie de interesse se encontra no meio micelar, suas características fotoluminescentes podem ser bem distintas (Ingle e Crouch, 1988).

A GAL é uma amina terciária cuja constante ácida ( $pK_a$ ) em água é 8,3, enquanto que no meio aquoso rico em micelas de SDS é 9,3 (Culzoni et al., 2010). Tal diferença é decorrência da estabilização da forma protonada da GAL pela formação do par iônico entre a carga positiva da GAL e a carga negativa superfície da micela de SDS.

Na Figura 59 é mostrado o diagrama de distribuição das espécies protonada e neutra da GAL em água e em meio aquoso rico em micelas de SDS, em função

do pH da solução. O gráfico foi construído a partir dos valores de alfa calculados (que é a razão entre a concentração de uma forma da GAL em relação ao total de espécies derivadas da GAL) em valores de pH diferentes tomando como base os valores de  $pK_a$  obtidos em meio aquoso e em meio micelar de SDS por Culzoni et al. (2000). O ponto que as curvas se encontram é onde: (i) os valores de alfa são iguais para a espécie ácida e neutra e (ii) o valor do pH é igual ao do  $pK_a$  da GAL. Portanto, abaixo do  $pK_a$  (valores de pH mais ácidos) a espécie protonada é a predominante, enquanto que a acima do  $pK_a$  (valores de pH mais básicos) a forma neutra da GAL predomina no sistema.

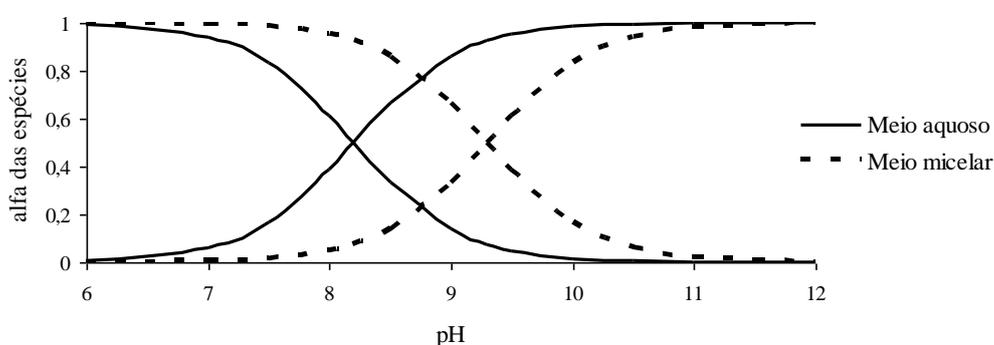


Figura 59. Diagrama de distribuição (alfa das espécies) da galantamina em função do pH dos meios - aquoso (linha cheia) e micelar de SDS (linha pontilhada).

Ainda segundo Culzoni et al. (2010), a fluorescência mais intensa para a GAL ocorre em meio rico em micelas de SDS e em pH abaixo de 8, indicando que a forma protonada (carregada positivamente) deve ser predominante nas determinações da GAL em meio organizado com micelas de SDS.

Diante do exposto, o surfactante escolhido para o desenvolvimento do método por MLC para GAL e seus principais metabólitos foi o SDS e todas as fases móveis micelares e soluções foram mantidas em pH na faixa entre 3 e 8 (faixa essa que também é apropriada para a coluna de fase estacionária C18 utilizada no trabalho).

A fim de conhecer o perfil cromatográfico da GAL e dos quatro metabólitos principais (*N*-óxido galantamina ou NOx, *O*-desmetil galantamina ou OD, *N*-desmetil galantamina ou ND, e epigalantamina ou EP) em condições cromatográficas com fase móvel rica em micelas de SDS e com fase estacionária modificada com esse surfactante foi testada uma composição de fase móvel

micelar baseada nas condições indicadas por Berthod e García-Alvarez-Coque (2000). Essa condição consistiu de solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) que é misturada ao modificador orgânico ACN no sistema cromatográfico de modo a se manter a proporção fixa (eluição isocrática) de fase aquosa/modificador orgânico igual a 91/9% (v/v). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $30^\circ\text{C}$  e volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ . As soluções-padrão dos analitos foram preparadas diluindo quantidades conhecidas das soluções estoque dos analitos em solução idêntica a fase móvel micelar. Os valores dos comprimentos de onda de excitação máximos obtidos para GAL e seus metabólitos ficaram na faixa de 285 a 290 nm. Desta forma, optou-se por fixar o  $\lambda_{\text{exc}}$  dos analitos em 285 nm, valor de  $\lambda_{\text{exc}}$  máximo para GAL, com intuito de privilegiar a detecção desse analito. Os pares de comprimentos de onda de excitação e de emissão ( $\lambda_{\text{exc/em}}$ ), em nm, apresentados na Tabela 30 e usados para a detecção das substâncias foram definidos a partir do espectro em três dimensões das substâncias obtidas em meio rico em micelas de SDS durante corridas cromatográficas exploratórias com cada um dos analitos.

Tabela 30: Comprimentos de onda de excitação e de emissão máximos ( $\lambda_{\text{exc/em}}$ ) dos analitos OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos nas soluções de composição escolhida<sup>1</sup>.

	OD	NOx	GAL	ND	EP
$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)			285		
$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	334	332	330	334	334

<sup>1</sup> Composição do solvente das soluções individuais: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%).

Na Figura 60 são mostrados os cromatogramas resultantes da introdução de solução padrão de cada uma das substâncias OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) nas condições cromatográficas escolhidas. A intensidade de fluorescência foi normalizada de tal forma que os picos tivessem a mesma intensidade de forma a permitir que se observe claramente a posição de cada um (sozinho em solução) no seu respectivo cromatograma. Vale lembrar que a

fluorescência medida foi denominada como “sinal” em todos os cromatogramas apresentados.

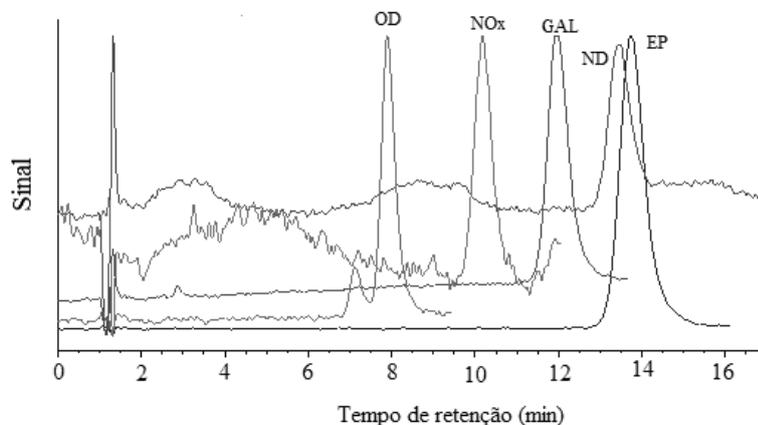


Figura 60. Cromatogramas advindos da injeção de solução de cada um dos padrões de OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{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

O tempo total de corrida foi de aproximadamente 15 min, sendo o OD o analito menos retido (pico eluído em 8 min), e o metabólito EP o mais retido (pico eluído em 14 min). A ordem crescente de tempo de eluição foi OD; NOx; GAL; ND; EP. Pode se observar que em tal condição os analitos ND e EP têm os tempos de retenção muito próximos (diferença de 0,3 min) e provavelmente co-eluiriam na corrida cromatográfica de uma mistura contendo os dois analitos.

O cromatograma obtido a partir de uma mistura de padrões da GAL e dos quatro metabólitos é mostrado na Figura 61. Nesse caso foram usadas as mesmas condições cromatográficas dos experimentos feitos com introdução das soluções padrões para cada um dos analitos e, como estes possuem pares de  $\lambda_{\text{exc/em}}$  bastante próximos, a detecção foi feita com um valor de compromisso igual a 285/330 nm. Os tempos de retenção dos analitos na mistura seguiram o mesmo padrão observado no experimento de introdução das soluções individuais, com o tempo total de corrida de aproximadamente 15 min e com os analitos ND e EP co-eluindo e formando um único pico no tempo de retenção de 13,7 min. Os demais analitos OD, NOx e GAL foram eluídos nos tempos de retenção iguais a 7,9; 10,2 e 12 min, respectivamente. Sendo assim, os ajustes necessários para atingir a

condição experimental do método foram feitos para separar os picos do ND e do EP num tempo total de corrida adequado.

Outro comentário pertinente diz respeito ao pequeno pico que segue o pico principal da OD. Nesse caso, o pequeno pico deve ser da especiação parcial do OD no pH 3,0 ou é proveniente de uma impureza presente no padrão de OD. No decorrer do trabalho, ao se estudar a variação do pH da fase móvel, a questão da especiação poderá ser confirmada ou descartada.

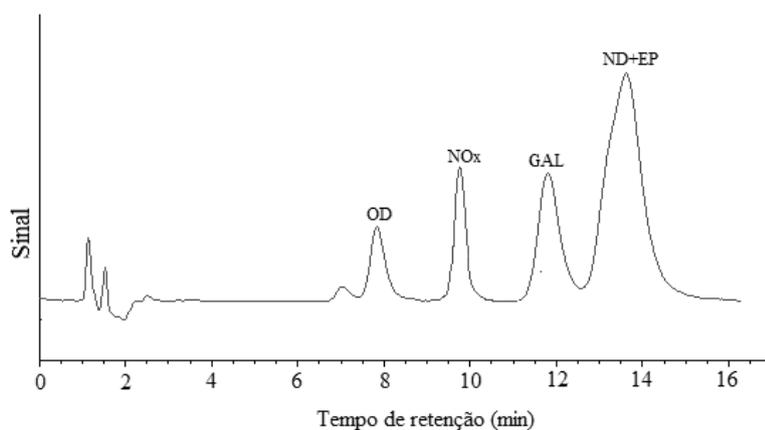


Figura 61. Cromatograma da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $30^\circ\text{C}$ ; medição de fluorescência em 285/330 nm.

### 5.1.2

#### Estudo da variação da temperatura da coluna cromatográfica

A fim de se obter a separação do par ND e EP, a temperatura da coluna cromatográfica foi diminuída de  $30^\circ\text{C}$  para  $25^\circ\text{C}$ . Os cromatogramas resultantes da variação da temperatura estão mostrados na Figura 62 sendo as demais condições cromatográficas mantidas idênticas às dos experimentos anteriores. A redução da temperatura resultou em uma melhora significativa na resolução dos picos, obtendo-se os tempos de retenção em 13 e 14,5 min respectivamente para ND e EP. Os tempos de retenção e o formato dos picos dos analitos OD, NOx e GAL não tiveram uma alteração significativa com a variação da temperatura. Porém, vale salientar que na temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e nas condições experimentais

utilizadas ainda não se obteve separação de linha base entre GAL e ND e entre ND e EP. De fato, a separação dos picos da GAL e ND piorou em relação à situação anterior, em virtude da diminuição do tempo de retenção do ND.

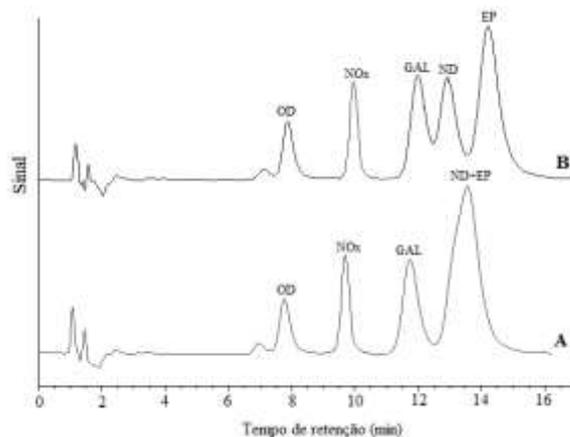


Figura 62. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NO<sub>x</sub> ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos em 30°C (A) e em 25°C (B). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato (10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 3,0) contendo SDS (50 mmol L<sup>-1</sup>), (Et)<sub>3</sub>N (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra 40 μL; vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; detecção em 285/330 nm.

O ajuste da temperatura da coluna para 20°C não produziu melhora alguma na qualidade da separação dos picos em relação ao observado no cromatograma obtido à 25°C. Desta forma, a temperatura da coluna escolhida foi 25°C.

### 5.1.3

#### Estudo da influência da natureza e porcentagem do modificador orgânico na fase móvel micelar

A adição do solvente orgânico (modificador orgânico), mesmo que em pequenas quantidades, aumenta a eficiência de separação por MLC, decrescendo o tempo de retenção das espécies (Jiménez et al., 1996). Assim, a natureza e a porcentagem do modificador orgânico foram testadas com o intuito de melhorar a qualidade da separação e diminuir o tempo total da corrida cromatográfica. Os solventes usados foram ACN, metanol e propan-2-ol, solventes comumente utilizados em métodos de separação por MLC. Uma mistura de padrões de GAL e de seus metabólitos foi introduzida no sistema usando as condições

cromatográficas estabelecidas até este ponto, variando-se apenas a natureza do modificador orgânico, presente na proporção de 9% (em volume). Porém, os cromatogramas resultantes não apresentaram alteração significativa na qualidade da separação, ou seja, nos tempos de retenção relativo dos analitos e no tempo total de corrida. Desta forma, a ACN foi mantida como modificador orgânico, necessitando-se ajustar a sua proporção ideal na fase móvel micelar.

A avaliação do efeito da proporção de ACN na fase móvel na separação dos analitos foi realizada em quatro níveis (7%; 9%; 12% e 15%), os quais ainda garantem a integridade das micelas no meio (Khaledi, 1997). A mistura da fase aquosa micelar com a ACN foi feita no sistema cromatográfico. Na Figura 63 são mostrados os cromatogramas da mistura de GAL e metabólitos com fases móveis micelares com diferentes proporções de ACN.

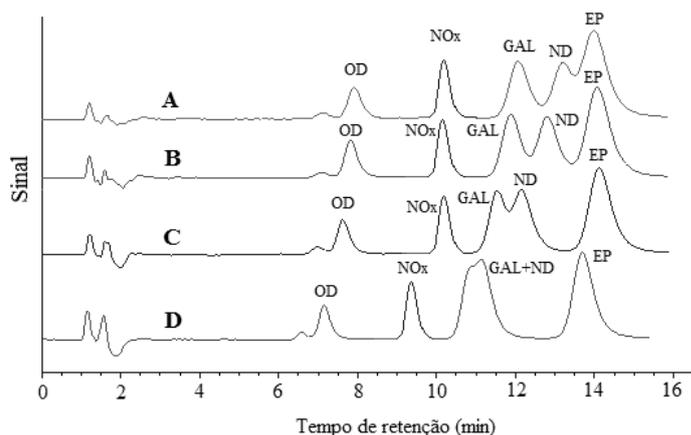


Figura 63. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos com fases móveis contendo diferentes proporções de ACN: 7% (A), 9% (B), 12% (C) e 15% (D). Composição da fase móvel micelar: solução tampão de acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,0) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ( $\text{Et}_3\text{N}$ , 0,5%) e complemento de ACN. Volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; detecção em 285/330 nm.

O aumento da porcentagem de ACN na fase móvel diminuiu sutilmente o tempo de retenção de todos os analitos com exceção do ND, cujo tempo de retenção foi reduzido mais proeminentemente com o aumento da proporção de ACN. O ND que co-eluiu parcialmente com o EP em fase móvel contendo 7% de ACN (cromatograma 63 A), se sobrepôs com o pico da GAL em fase móvel contendo 15% de ACN (cromatograma 63 D). A discrepância no comportamento de retenção do metabólito ND em relação ao dos demais analitos pode ser justificada pela ausência, em sua estrutura química, de um substituinte no

grupamento amina fazendo dessa molécula mais suscetível as variações de polaridade da fase móvel. Dentre as quatro proporções de ACN testadas, a presença de 9% na fase móvel apresentou a melhor separação entre os picos dos analitos GAL/ND/EP (cromatograma 63 B), porém, como já se havia mostrado, com resolução ( $R_S$ ) limitada entre GAL e ND ( $R_S = 1,5$ ).

#### 5.1.4

##### **Estudo da influência do pH da fase móvel**

Os experimentos de separação foram feitos, até este ponto do trabalho, com a fase móvel tamponada em pH 3,0 com a finalidade de manter a GAL e, possivelmente, seus metabólitos, carregados positivamente em solução, promovendo desta forma a interação eletrostática destes com as micelas do surfactante aniônico. Com intuito de avaliar a influência do valor do pH na separação dos analitos foram testadas fases móveis com os valores de pH ajustados em 5,0 (tampão acetato) e em 8,0 (tampão fosfato). Vale salientar que em pH 8,0 ainda há predominância das espécies catiônicas da GAL em meio micelar (ver Figura 59).

Inicialmente avaliou-se o comportamento de retenção das soluções padrões de cada um dos analitos nas condições cromatográficas escolhidas com o intuito de se verificar a ordem de eluição dos mesmos, seguindo o mesmo procedimento adotado para a fase móvel pH 3,0. Na Figura 64 são mostrados os cromatogramas resultantes das introduções das soluções de cada um dos analitos em fase móvel micelar tamponada em pH 5,0 (Figura 64 A) e pH 8,0 (Figura 64 B). A composição da fase móvel consistiu de solução tampão apropriada contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5% de  $(\text{Et})_3\text{N}$  sendo esta misturada no cromatógrafo com ACN de modo a manter a proporção 91/9% v/v. As outras condições do experimento são indicadas na legenda da Figura 64.

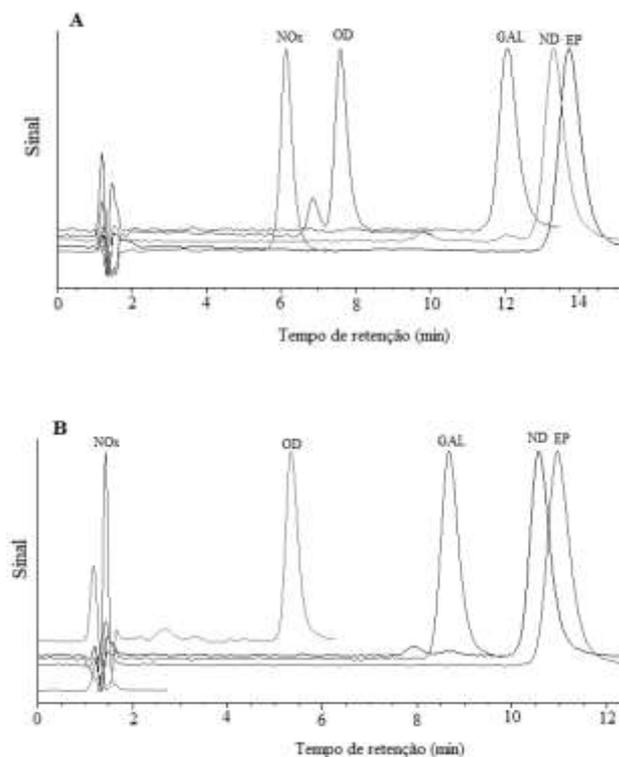


Figura 64. Cromatogramas advindos da injeção de solução de cada um dos padrões de OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em (A) fase móvel tamponada em pH 5,0 (tampão acetato;  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e em (B) fase móvel tamponada em pH 8,0 (tampão fosfato;  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Fase móvel micelar contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; detecção em 285/334 nm (OD), 285/320 nm (NOx), 285/330 nm (GAL), 285/334 nm (ND) e 285/334 nm (EP).

A primeira diferença a ser observada com a elevação do pH da fase móvel foi a inversão na ordem de eluição dos analitos OD e NOx, com o menor tempo de retenção para o NOx. Assim, a ordem de eluição dos analitos com fase móvel com valor de pH tanto em 5,0 quanto em 8,0 foi: NOx; OD; GAL; ND e EP. O resultado permite ainda prever que os picos do ND e do EP se sobreporiam parcialmente nas condições em questão não importando o valor do pH. No entanto, observa-se uma maior diferença entre os tempos de retenção da GAL e do ND e EP, abrindo a possibilidade de que um ajuste mínimo possa permitir a acomodação dos três picos em condição de resolução adequada para a determinação seletiva.

Como verificado anteriormente, o tempo de retenção do metabólito ND varia significativamente em função da porcentagem de ACN na fase móvel. Assim, fez-se necessário o ajuste da proporção desse modificador químico entre 5 e 20% a fim de avaliar o efeito na separação dos picos dos analitos GAL, ND e

EP, nas fases móveis com os respectivos valores de pH de 3,0; 5,0 e 8,0. O comportamento de retenção do ND em função da porcentagem de ACN nas fases móveis de pH 5,0 e pH 8,0 foi bastante similar ao observado para a fase móvel micelar de pH 3,0. Porém, a qualidade da separação entre a GAL e seus metabólitos ND e EP foi diferente. Para fase móvel de pH 8,0, o melhor resultado foi obtido com a porcentagem de ACN de 12%, contudo, a sobreposição dos picos ND e EP ainda foi significativa. Para a fase móvel de pH 5,0, o melhor resultado foi conseguido com 9% de ACN, igual ao que foi observado com fase móvel tamponada em pH 3,0. Esses três cromatogramas, os que promoveram os melhores resultados de separação da GAL e seus metabólitos em cada um das diferentes condições de pH, são mostrados na Figura 65.

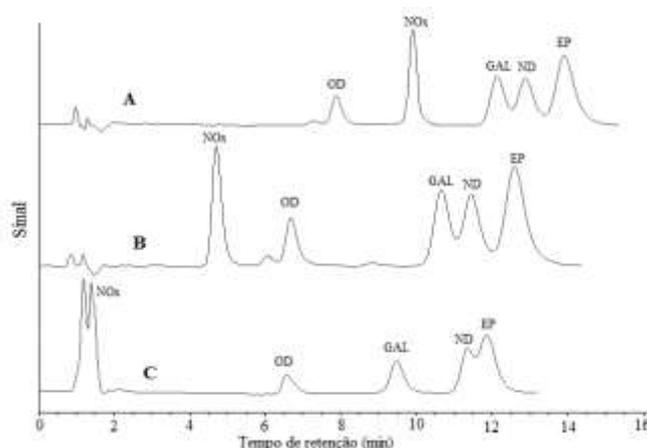


Figura 65. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) usando: (A) fase móvel micelar com pH 3,0 (tampão acetato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 9% de ACN (B) fase móvel micelar com pH 5,0 (tampão acetato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 9% de ACN e (C) fase móvel micelar com pH 8,0 (tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 12% de ACN. As fases móveis continham SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%). Volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; detecção em 285/330 nm.

Os resultados do experimento mostraram também que o tempo total da corrida cromatográfica decresceu em função do aumento do valor do pH da fase móvel micelar, diminuindo de aproximadamente 15 min em pH 3,0 para 12 min em pH 8,0, ou seja, uma redução significativa de 20%. Em contrapartida, o aumento do pH da fase móvel resultou na piora da resolução da separação entre os picos ND e EP.

O NOx foi o analito que sofreu a maior variação do tempo de retenção com o aumento do pH, sendo este eluído em 10 min na fase móvel com pH 3,0,

em 6 min na fase móvel com pH 5,0 e em menos de 1,5 min na fase móvel com pH 8,0. Com o aumento do pH da fase móvel para 8,0 provavelmente a forma com carga negativa do metabólito NOx é a predominante, sendo eluída juntamente com o volume morto. Nesta condição este analito foi repelido pelas cargas negativas da superfície da micela de SDS da fase móvel, e pelas cargas negativas da fase estacionária modificada alterando o seu comportamento de retenção de *binding* para *nobinding*. Os demais analitos não tiveram seus tempos de retenção alterados significativamente em função da elevação do valor do pH da fase móvel.

A relação entre as intensidades do pico adjacente ao metabólito OD e o próprio pico do OD permaneceu a mesma nos resultados obtidos para as fases móveis em pH 3,0 e 5,0, porém em fase móvel pH 8,0 não foi observado a presença do pico adjacente ao OD. O sinal fluorescente dos analitos sofreu uma diminuição em fase móvel pH 8,0, em até 60% para OD, em relação aos resultados obtidos nas fases móveis pH 3,0 e 5,0. Com o aumento do pH da fase móvel para 8,0 provavelmente a espécie neutra foi a predominante nesse pH e a fluorescência dos analitos foi desfavorecida. Nesse contexto, a ausência do pequeno pico adjacente ao OD pode ser justificada pela diminuição do sinal fluorescente nesse pH e, portanto, deve ser resultado de uma impureza presente no padrão de OD. A possibilidade de ser proveniente da especiação do metabólito pode ser descartada, uma vez que a relação entre os picos, em questão, permaneceu a mesma em pH 3,0 e 5,0.

Em consequência dos resultados, o uso da fase móvel com pH 8,0 para o método foi descartado. As fases móveis tamponadas em pH 3,0 e em pH 5,0 resultaram ser promissoras para promover a separação dos picos da GAL, ND e EP, porém a fase móvel em pH 5,0 foi a que promoveu o menor tempo total de corrida. Desta forma, se deu continuidade ao processo de ajuste das condições do método com fase a móvel micelar tamponada com acetato em pH 5,0 e proporção de ACN de 9%.

### 5.1.5

#### Estudo da influência da concentração do surfactante

Para avaliar o efeito da variação da concentração de SDS na fase móvel micelar na resolução dos picos cromatográficos e no tempo total de corrida, as concentrações de SDS foram testadas em dois níveis acima da CMC (40 e 100 mmol L<sup>-1</sup>). Esses dois níveis de concentrações de SDS foram inicialmente testados com fase móvel contendo 9% de ACN, de modo a se ter a comparação com os resultados já mostrados com a fase móvel micelar contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS. Porém, os resultados em termos de separação dos picos GAL, ND e EP não foram satisfatórios e piores que os obtidos para 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% de ACN. Nessa proporção de ACN a fase de móvel contendo 40 mmol L<sup>-1</sup> de SDS produziu uma redução da resolução para o par ND/GAL ( $R_s = 1,3$ ) em 40% comparado a resolução obtida para esse par quando se utiliza 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% de ACN. Em fase móvel contendo 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% de ACN o par ND/EP foi co-eluído. Como descrito, pequenas variações na porcentagem de ACN afetam significativamente a separação entre os picos dos analitos GAL, ND e EP. Dessa forma, fez-se o ajuste da porcentagem de ACN (de 5 a 20%) nas fases móveis contendo 40 e 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS.

Para a fase móvel contendo 40 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, a porcentagem de ACN que reproduziu o melhor resultado foi 10%, enquanto que para a fase móvel contendo 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS o melhor resultado foi com 15% de ACN. Para fins de comparação, na Figura 66 são mostrados os cromatogramas resultantes da variação da concentração do surfactante aniônico SDS na fase móvel contendo a proporção de ACN específica que produziu melhor resultado para cada caso, ou seja, 10% na fase móvel com 40 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, 9% na fase móvel com 50 mmol L<sup>-1</sup> e 15% na fase móvel com 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS.

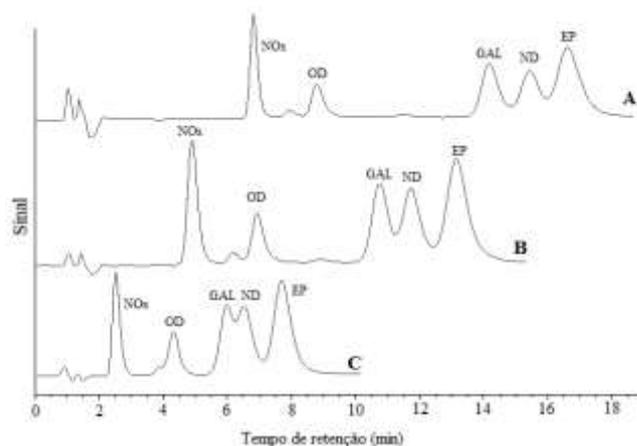


Figura 66. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) variando a concentração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

De acordo com os cromatogramas obtidos (Figura 66) pode se observar que a variação da concentração do surfactante alterou a resolução entre os picos, os tempos de retenção e também o tempo total de corrida, considerando a eluição do analito mais retido, que variou de 18 (para 40 mmol L<sup>-1</sup> de SDS) para 9 min (para 100 mmol L<sup>-1</sup> de SDS). Como era de se esperar, todos os analitos presentes na solução introduzida no sistema cromatográfico tiveram seus tempos de retenção reduzidos em função do aumento da concentração de SDS. Indicando que a GAL e seus quatro metabólitos possuem comportamento *binding* em pH 5,0, ou seja, interagem mais efetivamente com as micelas de SDS na fase móvel do que com a fase estacionária modificada pelos monômeros do SDS. A variação da concentração de SDS altera o número de micelas na fase móvel, porém a estrutura modificada da fase estacionária pelos monômeros permanece inalterada, o que acarreta em um desequilíbrio da interação micela-analito-fase estacionária modificada. O aumento do número de micelas na fase móvel favorece uma maior interação analito-micela, diminuindo a interação analito-fase estacionária modificada. Assim, o tempo de retenção da GAL e metabólitos diminuíram, já que as micelas percolam pela coluna na fase móvel carregando os analitos.

Em relação à separação dos picos, com o aumento da concentração de SDS de 50 (cromatograma 66 B) para 100 mmol L<sup>-1</sup> (cromatograma 66 C) foi possível observar uma piora na separação dos picos cromatográficos da GAL e ND,

resultando na coeluição parcial entre esses analitos. Os picos cromatográficos dos analitos GAL, ND e EP, nas fases móveis contendo 40 ou 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS apresentaram-se separados, porém não em linha de base. Em função do menor tempo total de corrida, a concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS foi escolhida para continuidade dos estudos.

### 5.1.6

#### **Estudos com fase estacionária com porosidade de 300 Å**

Como a separação entre os picos da GAL, ND e EP não foi de linha base, um esforço adicional foi feito usando uma fase estacionária com maior porosidade, elevando de 120 para 300 Å. Os poros são cavidades e/ou canais de comunicação com a superfície da sílica, cujos tamanhos típicos desses em colunas de cromatografia líquida comuns estão entre 80 e 200 Å. As colunas cromatográficas com fase estacionária de porosidade entre 300 e 1000 Å são bastante utilizadas em MLC para evitar a exclusão estérica das micelas, que possuem diâmetro de 20 a 50 Å, melhorando o desempenho da técnica, pois levam a uma eluição em menor tempo de retenção dos solutos (Berthod e García-Alvarez-Coque, 2000; Ruiz-Ángel et al., 2009). Segundo McCormick et al. (2000) a fase estacionária de maior porosidade aumenta a força de eluição das fases móveis micelares compostas por todos os tipos de surfactante, revelando assim, o real poder de eluição dessas fases. Apesar da mudança da porosidade da fase estacionária para 300 Å, os outros parâmetros cromatográficos estudados com a fase estacionária de 120 Å foram mantidos (50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% de ACN).

O cromatograma obtido a partir de uma solução dos padrões de GAL e seus metabólitos no sistema com fase estacionária de porosidade igual a 300 Å é apresentado na Figura 67 juntamente com o obtido nas mesmas condições com a fase estacionária de porosidade 120 Å. Analisando os resultados foi possível constatar que a fase estacionária de maior porosidade produziu picos cromatográficos mais finos (maior eficiência) e diminuiu significativamente o tempo total de corrida (que foi reduzido de 14 min para 8 min). A melhora do perfil cromatográfico pode ser explicada pelo aumento da força de eluição da fase móvel micelar em consequência da diminuição da exclusão das micelas nos poros

das partículas de sílica, onde se situam mais de 99% da fase ligada C18 (McCormick et al., 2000). Apesar da melhora no perfil cromatográfico, os picos correspondentes aos analitos GAL e ND ainda não se encontram bem resolvidos, fazendo-se necessário um novo ajuste das condições da fase móvel visando obter a melhor separação de analitos.

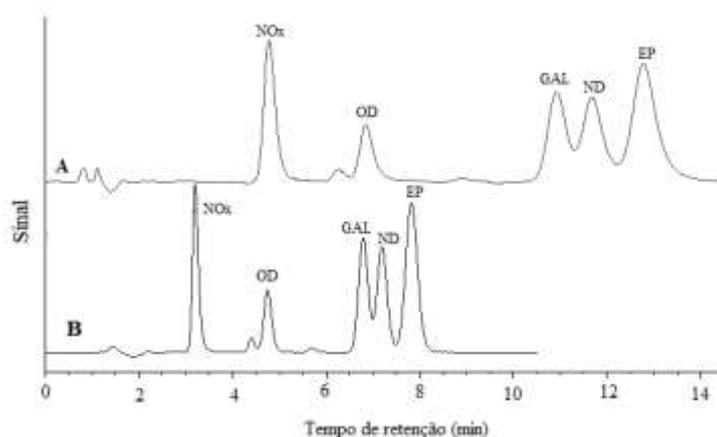


Figura 67. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) usando colunas cromatográficas com fase estacionária C18 com porosidade de A) 120 Å e B) 300 Å. Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5) contendo SDS ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de 40  $\mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de 25°C; detecção em 285/330 nm.

Nos estudos com a coluna cromatográfica de fase estacionária de 120 Å pôde se concluir que a fase móvel contendo concentração de SDS acima de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  resultou em uma piora na qualidade da separação dos picos da GAL, ND e EP. Assim, um experimento foi realizado com fase móvel contendo concentração de SDS igual a 25  $\text{mmol L}^{-1}$  nas mesmas condições experimentais estabelecidas para 50  $\text{mmol L}^{-1}$ . Na Figura 68 são mostrados os cromatogramas resultantes da análise de uma mistura de padrões da GAL e seus quatro metabólitos em fases móveis com tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo 9% ACN e SDS nas concentrações de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  e 25  $\text{mmol L}^{-1}$ .

Pelos cromatogramas verificou-se que o comportamento de retenção dos analitos em função da variação da concentração de SDS segue a mesma tendência não importando a porosidade da fase estacionária testada, ou seja, os tempos de retenção da GAL e seus metabólitos aumentaram na medida em que se diminuiu a concentração de SDS na fase móvel micelar. O aumento de tempo de corrida

cromatográfica, levando em consideração o analito mais retido foi de mais de 60%, passando de 8 min ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS) para 13 min ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS).

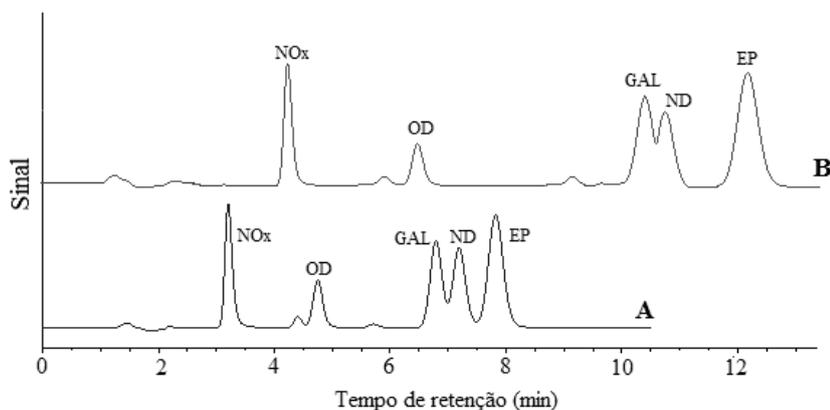


Figura 68. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da concentração de SDS na fase móvel:  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (A) e  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  (B). Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (91/9% v/v). Volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; detecção em 285/330 nm.

Com a fase móvel contendo  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS (cromatograma B) houve uma piora na resolução entre os picos dos analitos GAL e ND ( $R_s = 1,0$ ), quando comparado com a resolução de 1,7 obtida utilizando a fase móvel de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS (cromatograma 68 A). Apesar disso, os resultados com a fase contendo  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS (cromatograma 68 B) foram promissores, já que o metabólito EP ficou bem separado do ND (resolução de linha de base e com diferença de tempos de retenção de 1,6 min). A maior separação entre os picos do ND e do EP, aliado à melhor eficiência dos picos obtida com a coluna com porosidade de  $300 \text{ \AA}$ , possibilitaria que um ajuste de porcentagem de ACN pudesse vir a acomodar o ND numa posição entre a GAL e o EP que implicasse separação adequada. Assim, a fase móvel contendo  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS foi adotada para o prosseguimento com o trabalho usando a coluna com porosidade de  $300 \text{ \AA}$ .

Com o intuito de tentar aumentar a resolução dos analitos GAL, ND e EP, a vazão da fase móvel foi diminuída de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  para  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  o que resultou nos cromatogramas apresentados na Figura 69. O ajuste melhorou a separação entre os analitos GAL e ND (resolução aumentou de 1,0 para 1,6) e

aumentou a distância entre os picos dos analitos ND e EP. Desta forma, os testes prosseguiram com a vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

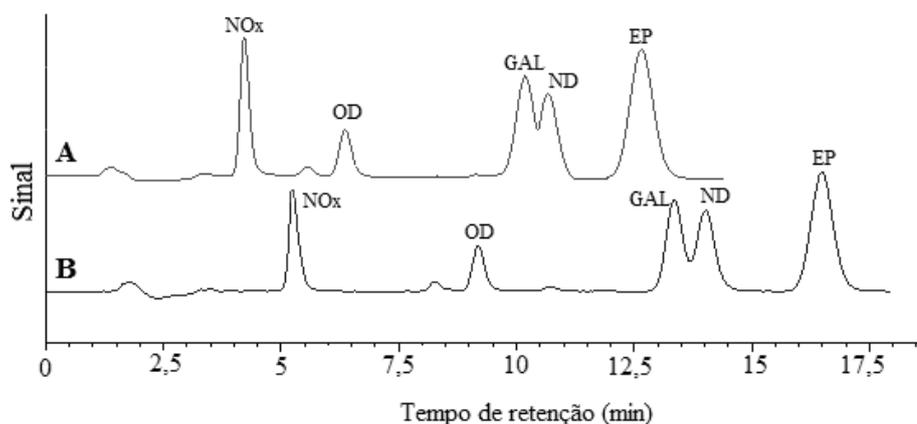


Figura 69. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da vazão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

Nessas condições de vazão, foi testado um ajuste da porcentagem de ACN na fase móvel com pH 5,0 e contendo  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS. No experimento, cinco níveis distintos de ACN foram avaliados: 9%; 5%; 3%; 2% e 1% (Figura 70). Como o esperado, em função dos resultados com a coluna de  $120 \text{ \AA}$ , o tempo de retenção do pico cromatográfico do ND, dentre os cinco analitos, foi o mais afetado pela diminuição da porcentagem de ACN na fase móvel, conseqüentemente, houve uma gradativa diminuição na diferença entre os tempos de retenção dos picos do ND e do EP. Vale salientar que a variação da porcentagem de ACN não alterou significativamente o tempo total da corrida cromatográfica.

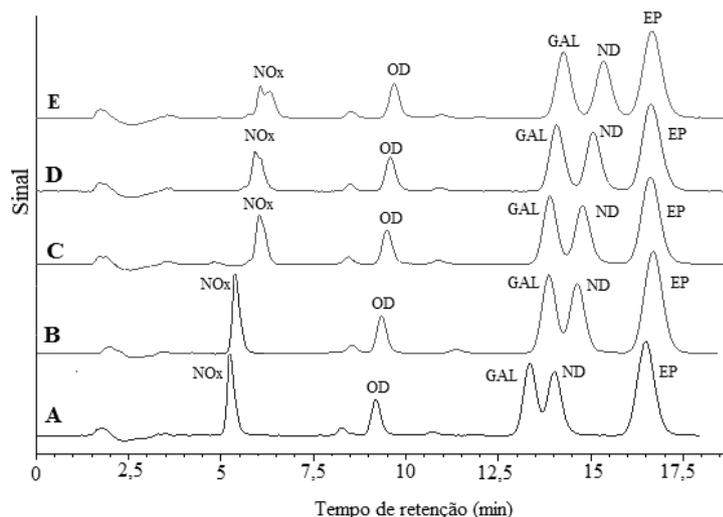


Figura 70. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), NOx ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), GAL ( $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), ND ( $9,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EP ( $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da porcentagem de ACN na fase móvel: 9% (A) e 5% (B), 3% (C), 2% (D) e 1% (E). Composição da fase móvel micelar: solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (v/v). Volume de injeção  $40 \mu\text{L}$ ; vazão de fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detecção em  $285/330 \text{ nm}$ .

No entanto, pode se observar que quanto menor a porcentagem de ACN na fase móvel, maior foi a formação de pico duplo para o NOx em fases com porcentagem de ACN abaixo de 2%. Tal comportamento não havia sido observado em nenhuma outra etapa do estudo nos quais diferentes parâmetros experimentais foram variados. A baixa porcentagem de solvente orgânico no sistema cromatográfico torna a transferência de massa nos equilíbrios envolvidos mais lenta, o que pode explicar perda de simetria de picos e formação de mais de um máximo na distribuição das espécies numa mesma zona analítica. Para os picos dos outros analitos, esse efeito da lenta transferência de massa não provocou deformações nem alargamentos significativos. Por outro lado, considerando a separação entre os picos GAL, ND e EP, a fase móvel contendo 1% de ACN promoveu o melhor resultado com resolução de 2,3 para o par GAL e ND e de 2,5 para o par ND e EP, praticamente separações de linha base.

Com intuito de se encontrar um compromisso entre o melhor perfil cromatográfico do pico do analito NOx e a melhor separação entre os picos GAL, ND e EP, a fase móvel com 3% de ACN (cromatograma 70 C) foi escolhida. As condições promoveram a separação dos analitos em aproximadamente 17,5 min (medido pelo tempo de retenção do analito mais retido), com um gasto total de solvente orgânico de 0,42 mL por corrida e uma concentração baixa de surfactante

SDS (25 mmol L<sup>-1</sup>). Todas as separações foram de linha base, com excessão para os picos GAL e ND, para a qual se alcançou resolução de 1,9, bastante adequada para um sistema complexo como este. Os tempos de retenção foram: NOx 5,6 min, OD 9,8 min, GAL 13,7 min, ND 14,6 min e EP 16,6 min.

Para fins comparativos, na Figura 71 são apresentados os cromatogramas obtidos de uma solução dos padrões de GAL e seus metabólitos utilizando os parâmetros cromatográficos escolhidos para a coluna de porosidade igual a 120 Å (cromatograma A - 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 9% de ACN) e para a coluna de porosidade igual a 300 Å (cromatograma B - 25 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 3% de ACN). A coluna cromatográfica de 300 Å apresentou maior eficiência (picos mais finos) e aumento de resolução de 16% para o par GAL/ ND (de 1,6 para 1,9) e de 70% para o par ND/EP (de 1,1 para 3,7), considerados críticos. Levando em consideração as melhorias apresentadas a coluna de porosidade de 300 Å foi a escolhida.

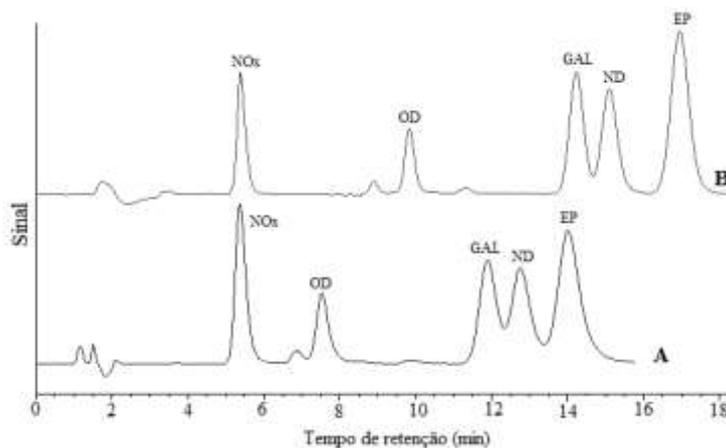


Figura 71. Cromatogramas da mistura contendo OD ( $4,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), NOx ( $9 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), GAL ( $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), ND ( $9,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e EP ( $4,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) variando a porosidade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

Na Tabela 31 são apresentadas as condições cromatográficas escolhidas para realizar a separação cromatográfica da GAL e seus quatro metabólitos por MLC com detecção fluorimétrica.

Tabela 31: Composição da fase móvel otimizada e parâmetros cromatográficos.

Parâmetros	Condições otimizadas	
Coluna cromatográfica	Zorbax 300 Extend C18 4,6 x150 mm, dp 5µm e porosidade de 300 Å	
Composição da fase móvel micelar	Solução tamponada com acetato de sódio:ácido acético (10 mmol L <sup>-1</sup> ) ajustado para pH 5,0 contendo SDS (25 mmol L <sup>-1</sup> ) e 0,5 % (Et) <sub>3</sub> N	
Modificador orgânico (proporção em volume)	ACN (3%)	
Eluição	Isocrática	
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,8	
Temperatura da coluna (°C)	25	
Volume de injeção (µL)	40	
Tempo total da corrida (min)	17,5	
	NOx	5,6
Tempo de retenção (min)	OD	9,8
	GAL	13,7
	ND	14,6
	EP	16,6
Volume de injeção (µL)	40	
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	285/330	
Detecção	Fluorimétrica	

## 5.2

### Validação do método

O método de determinação de GAL e metabólitos por MLC com detecção fluorimétrica foi validado por meio da obtenção dos seguintes parâmetros analíticos de mérito: LOD, LOQ, curva analítica, faixa de trabalho, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão (recuperação). Todas as avaliações seguiram, dentro do que foi considerado adequado, as orientações do documento normativo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2010) e Manual da Garantia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Adicionalmente foram realizados estudos de interferência, comparação de desempenho entre métodos analíticos na determinação da GAL e o cálculo das incertezas associadas à quantificação da GAL e seus quatro metabólitos.

### 5.2.1

#### **Parâmetros analíticos de mérito para a quantificação da galantamina e seus metabólitos**

Os valores de LOD e de LOQ, em  $\text{ng g}^{-1}$ , foram determinados seguindo o critério definido no Capítulo 2, sendo os valores absolutos ALOD e ALOQ, em ng, calculados considerando a massa molar de cada analito, o volume de solução introduzido no sistema cromatográfico (40  $\mu\text{L}$ ) e os valores de LOD ou LOQ.

Um estudo metrológico de quantificação da GAL e dos metabólitos foi realizado utilizando uma curva analítica construída a partir da relação entre a massa introduzida de analito, em ng, e a área do pico correspondente ao respectivo analito. Para a construção da curva analítica, foram preparadas cinco soluções, em réplicas autênticas, dos padrões de GAL e seus metabólitos, nas concentrações: 1,58  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NOx; 3,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OD; 1,21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GAL; 1,23  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ND e 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de EP. Os volumes introduzidos dessas soluções variaram de 5 a 100  $\mu\text{L}$ , totalizando nove pontos (M1 a M9). O primeiro ponto de cada curva (M1) foi equivalente ao valor de ALOQ (valor expresso em ng) para cada analito. Os volumes de 5, 50 e 100  $\mu\text{L}$  foram introduzidos em cinco réplicas, a fim de se determinar a repetibilidade. As soluções utilizadas na construção da curva analítica e estudo da repetibilidade foram preparadas no dia da análise. Essas mesmas soluções foram armazenadas ao abrigo da luz e utilizadas no dia seguinte (24 h) para a avaliação da precisão intermediária. Na Tabela 32 são apresentados os valores de massa determinadas para cada analito, correspondente a um respectivo volume de introduzidos de solução.

Tabela 32: Valores de massa (ng) utilizados na construção da curva analítica a partir da introdução de volumes entre 5 e 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão<sup>1</sup>.

Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )		Massa injetada (ng)				
		NOx	OD	GAL	ND	EP
5	M1	7,9	17,8	6,0	6,2	4,0
7	M2	11,1	24,9	8,5	8,6	5,6
10	M3	15,8	35,6	12,1	12,3	8,0
20	M4	31,6	71,3	24,1	24,7	16,0
30	M5	47,4	106,9	36,2	37,0	24,0
40	M6	63,2	142,5	48,3	49,3	32,0
50	M7	79,0	178,1	60,3	61,6	40,0
80	M8	126,5	285,0	96,5	98,6	64,1
100	M9	158,1	356,3	120,7	123,3	80,1

<sup>1</sup>NOx ( $1,58 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); OD ( $3,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); GAL ( $1,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); ND ( $1,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e EP ( $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O tratamento dos dados das curvas foi realizado pelo método dos mínimos quadrados com regressão linear simples de forma a se obter as equações de reta e os valores de  $R^2$ . O  $R^2$  ajustado mostrou um bom comportamento linear para GAL e para os seus quatro metabólitos. A regressão linear foi calculada com todos os valores das réplicas para não haver diminuição de graus de liberdade. Para a avaliação da linearidade do modelo e a adequação da regressão foram calculados os resíduos pela diferença entre a área calculada pela equação da curva e a área experimental obtida por meio da integração dos picos cromatográficos.

Na Figura 72, Figura 73, Figura 74, Figura 75 e na Figura 76, são apresentadas as curvas analíticas e seus respectivos gráficos de resíduos padronizados (razão do valor do resíduo pelo erro puro) em função da massa introduzida para cada um dos analitos.

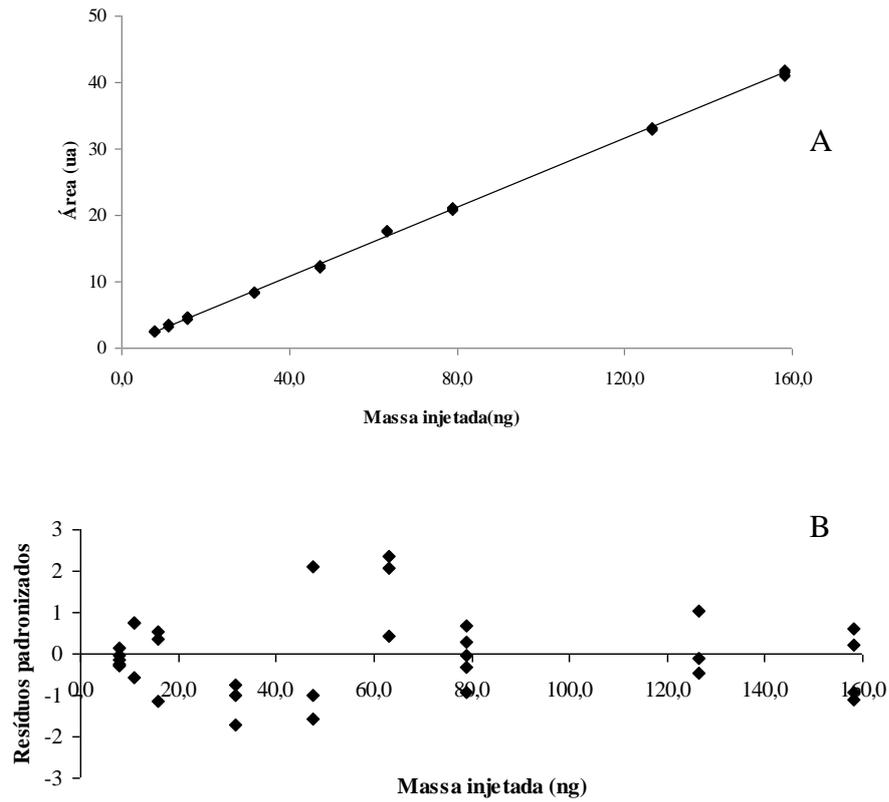


Figura 72. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito NOx.

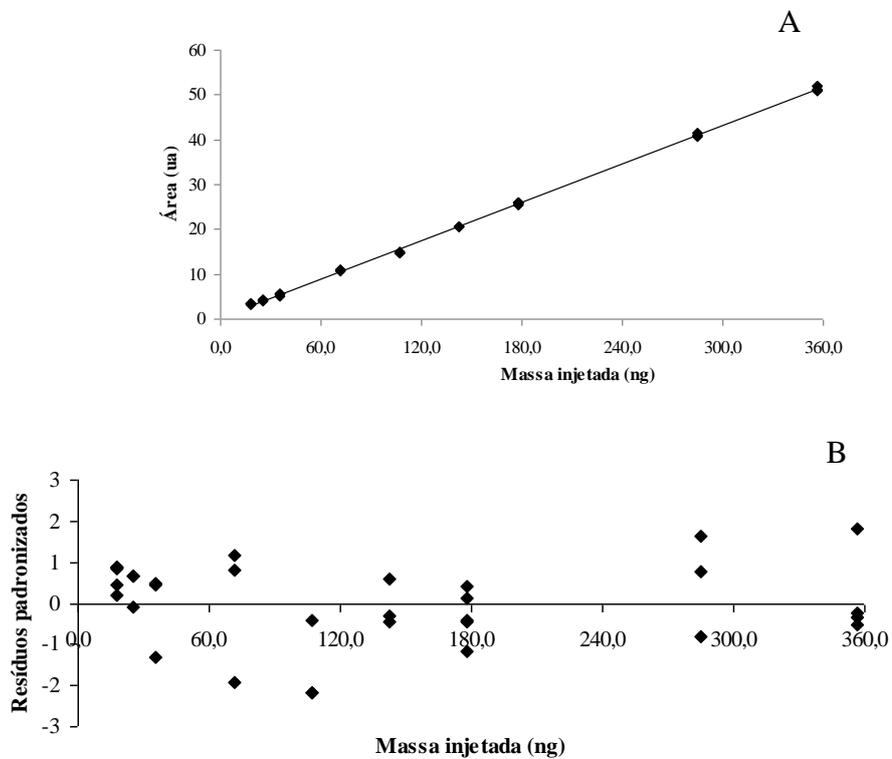


Figura 73. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito OD.

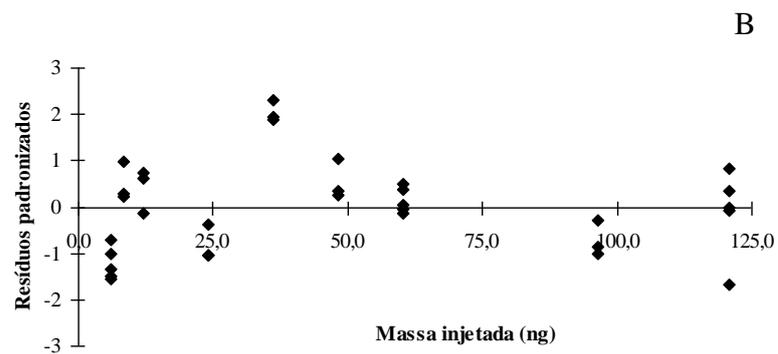
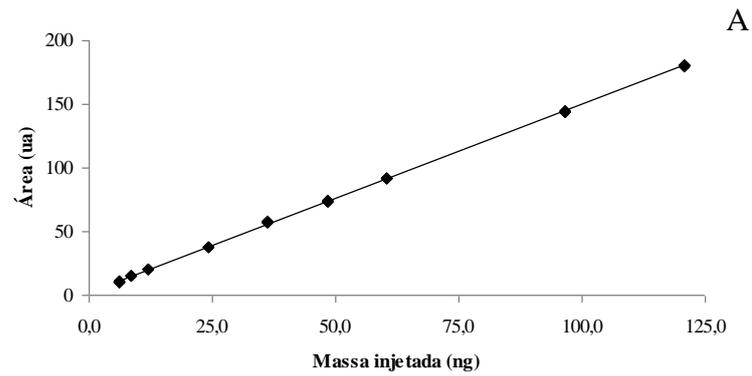


Figura 74. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para a GAL.

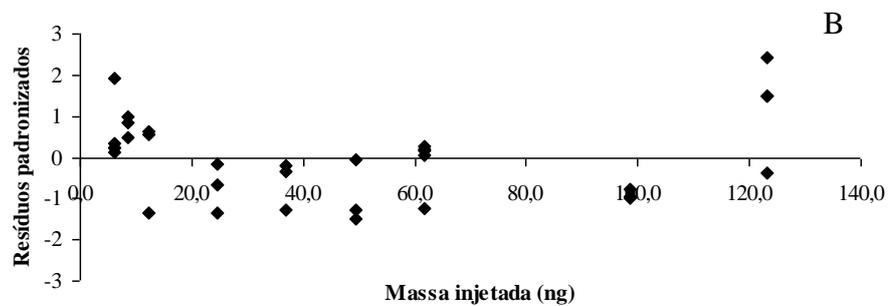
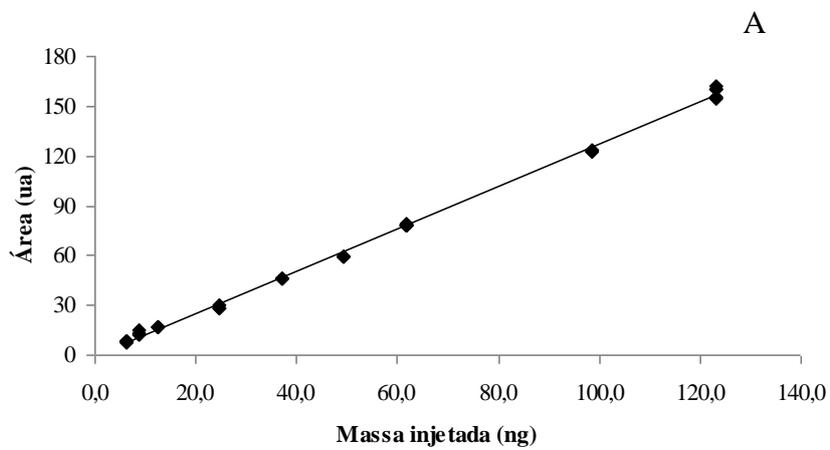


Figura 75. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito ND.

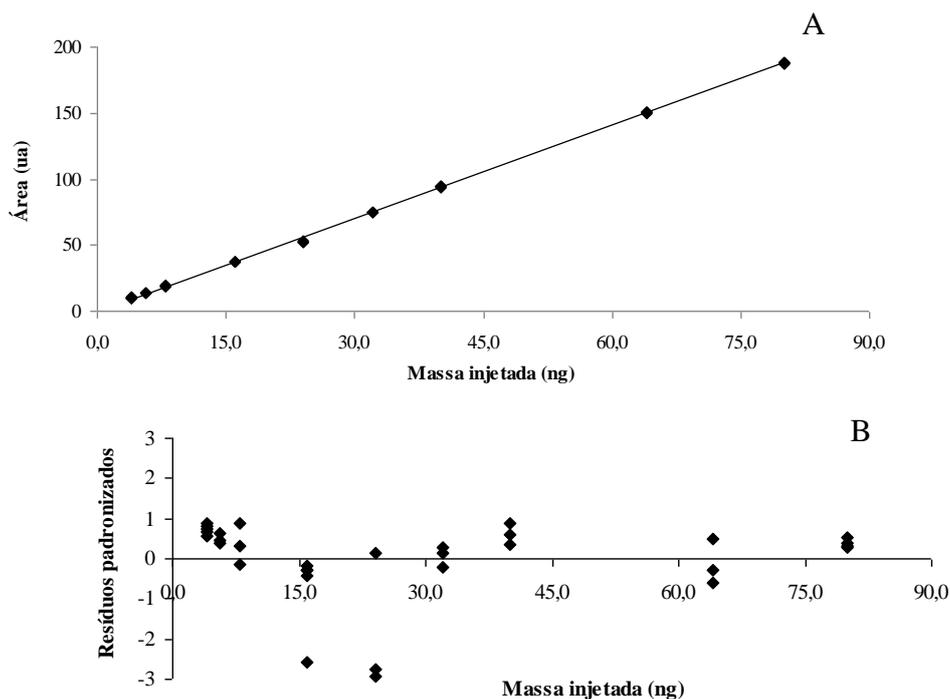


Figura 76. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos padronizados (B) para o metabólito EP.

Em todos os casos houve distribuição aleatória de resíduos, indicando a homocedasticidade das variâncias e a distribuição dos grupos de variância ao longo do eixo principal, indicando a linearidade da resposta analítica. A significância da diferença entre os valores das áreas calculadas e as experimentais foi determinada utilizando a estatística ANOVA (teste-F). Na Tabela 33 são mostradas as equações da reta para as cinco curvas analíticas, os valores de  $R^2$  ajustados correspondentes e a faixa de trabalho para todos os analitos estudados.

Comparando as equações, observa-se que a curva para EP possui a maior inclinação (maior sensibilidade) enquanto que a curva do OD produziu a menor sensibilidade de resposta. A diferença entre essas duas inclinações é maior que 15 vezes. O coeficiente de correlação e o  $R^2$  ajustado para todos os analitos foram maiores que 0,99. A faixa de LOD para os analitos ficou entre 73,4 a 342,9  $\text{ng g}^{-1}$ , enquanto que para LOQ, a faixa variou de 102,3 a 475,1  $\text{ng g}^{-1}$ , sendo os menores valores atribuídos ao metabólito EP e os maiores ao metabólito OD.

O cálculo de repetibilidade e da precisão intermediária foram feitos utilizando a estatística ANOVA, e os resultados indicaram que há uma homogeneidade nas variâncias dentro dos grupos (repetibilidade) e entre os grupos (precisão intermediária) para todos os analitos por MLC.

Todos os valores de repetibilidade e de precisão intermediária foram menores do que 4%, o que mostrou qualidade da resposta produzida pelo método. Os valores de precisão intermediária obtidos foram menores que os encontrados para a repetibilidade, o que indica que o preparo das réplicas autênticas resultou em maiores desvios do que a introdução de analitos em dias consecutivos. Tal resultado aponta para a estabilidade das soluções de GAL e metabólitos dentro do período da realização do teste.

Tabela 33. Parâmetros de analíticos de mérito para as curvas analíticas da GAL e seus metabólitos principais – NOx, OD, GAL, ND e EP.

Parâmetros de Mérito		NOx	OD	GAL	ND	EP
LOD (ng g <sup>-1</sup> )		131,9	342,9	92,5	100,7	73,4
ALOD (ng)		5,3	12,4	3,7	3,8	2,8
LOQ (ng g <sup>-1</sup> )		194,0	475,1	147,5	160,1	102,3
ALQ (ng)		7,8	17,1	5,9	6,1	3,9
Curva analítica		$y = (0,259 \pm 0,001) x +$	$y = (0,142 \pm 0,001) x +$	$y = (1,474 \pm 0,003) x +$	$y = (1,27 \pm 0,01) x -$	$y = (2,347 \pm 0,008) x -$
(sensibilidade em ng <sup>-1</sup> )		(0,5 ± 0,1)	(0,5 ± 0,1)	(2,5 ± 0,2)	(0,2 ± 0,6)	(0,1 ± 0,4)
R <sup>2</sup> ajustado		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Faixa de trabalho (ng)		7,9 – 158,1	17,8 – 356,3	6,0 – 120,7	6,2 – 123,3	4,0 – 80,1
Repetibilidade (%)	M1	4,0	3,0	0,1	2,0	1,0
	M7	1,0	2,0	0,2	2,0	1,0
	M9	1,0	1,0	0,3	2,0	0,3
Precisão intermediária (%)	M1	2,0	1,8	0,09	1,7	0,7
	M7	0,2	1,0	0,1	2,0	0,4
	M9	0,3	0,3	0,1	1,8	0,03

M1: NOx (7,9 ng); OD (17,81 ng); GAL (6,03 ng); ND (6,16 ng) e EP (4,0 ng).

M7: NOx (79,04 ng); OD (178,1 ng); GAL (60,3 ng); ND (61,64 ng) e EP (40,0 ng).

M9: NOx (158,08 ng); OD (356,29 ng); GAL (120,7 ng); ND (123,29 ng); EP (80,1 ng).

Cinco réplicas autênticas para cada ponto da curva.

### 5.2.2

#### Estimativa das incertezas associadas ao método

Para o estudo das incertezas combinadas e expandidas do método proposto, os principais componentes que contribuem para o cálculo de  $u_c$  e  $U$  na medição real da massa da GAL e de seus quatro metabólitos são: (i) coeficientes da curva analítica,  $u_{curva}$  (ii) repetibilidade,  $u_r$  (iii) precisão intermediária,  $u_{pi}$  e (iv) preparo das soluções, a partir da pesagem das massas dos padrões dos analitos,  $u_{sol}$  e (v) massa injetada,  $u_{mj}$ .

O cálculo da estimativa da incerteza associada aos coeficientes da curva analítica foi realizado com nove pontos. A partir da relação linear entre as massas injetadas e suas respectivas áreas foram calculados os coeficientes angular ( $m$ ) e o linear ( $b$ ) e suas respectivas incertezas,  $u_m$  e  $u_b$ . A partir desses dados, foi possível calcular a incerteza associada à curva analítica (Equação 45). Os valores calculados de  $u_m$ ,  $u_b$  e  $u_{curva}$  são apresentados na Tabela 5. A incerteza associada aos parâmetros da curva analítica para o metabólito OD (1,1 ng) resultou em maior incerteza, enquanto que a  $u_{curva}$  para GAL resultou em menor incerteza, 0,2 ng.

O cálculo da incerteza associada à repetibilidade e a precisão intermediária foi feito em três níveis de massa injetada, início, meio e fim da curva analítica, M1, M7 e M9, respectivamente. Foram preparadas cinco réplicas autênticas de cada uma dessas concentrações e calculado o desvio padrão relacionado à repetibilidade ( $s_r$ ) para  $n = 5$ . Estas mesmas soluções foram injetadas em dias consecutivos para o cálculo da precisão intermediária ( $s_{pi}$ ) para  $n = 5$ . Na Tabela 5 são mostrados os valores de incerteza associada à repetibilidade e a precisão intermediária, em ng, para os níveis de concentração citados. Todas as incertezas associadas à repetibilidade ficaram abaixo de 4%, comparadas com o valor nominal.

Os desvios em relação à repetibilidade foram maiores do que os obtidos para a precisão intermediária. Esse fato pode ser explicado pelo preparo das soluções em réplicas autênticas que agrega um desvio maior à medição comparado com o preparo de uma única solução injetada  $n$  vezes. Para a precisão intermediária se considera o desvio obtido nas medições de uma mesma solução, porém em tempos diferentes (24

h). As fontes que contribuem para a incerteza do resultado final são: a variação instrumental entre dias e a estabilidade da solução.

A curva analítica foi construída a partir da relação entre a massa injetada (massa estimada pelo volume injetado de solução) e a área do pico correspondente. Desta forma, a incerteza da massa injetada ( $u_{mi}$ ) deve ser considerada uma fonte de incerteza significativa, principalmente, para o primeiro ponto da curva analítica (M1), pois é a massa estimada pelo menor volume de injeção ( $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ ). A massa injetada ( $m_{injetada}$ ), em ng, foi então calculada pela Equação 64, onde:  $C_{injetada}$  é a concentração dos analitos ( $\text{ng mL}^{-1}$ ), e  $V_{injeção}$  é o volume de solução introduzido no cromatógrafo (mL). Vale lembrar que a  $C_{injetada}$  é a mesma em todos os pontos da curva analítica para cada analito e o  $V_{injeção}$  variou ao longo da curva de 5 a 100  $\mu\text{L}$ .

$$m_{injetada(\text{ng})} = C_{injetada(\text{ngmL}^{-1})} \times V_{injeção(\text{mL})} \quad (64)$$

A incerteza da massa injetada ( $u_{mi}$ ) foi calculada (Equação 65) pela raiz quadrada da soma da quadrática dos parâmetros utilizados para o cálculo da massa injetada, onde  $u_{sol}$  é a incerteza do preparo da solução e  $u_{V_{injeção}}$  é a incerteza do volume de injeção, estimado como o menor volume introduzido no cromatógrafo (0,1  $\mu\text{L}$ ) dividido por 2 ( $u_{V_{injeção}} = 0,05 \mu\text{L}$ ). Desta forma, considerou-se que a  $u_{V_{injeção}}$  tem uma incerteza de 50% da menor medida.

$$u_{mi} = \sqrt{((u_{sol}^2 / C_{injetada}^2) + (u_{V_{injeção}}^2 / V_{injeção}^2))} \quad (65)$$

A incerteza do preparo da solução,  $u_{sol}$ , é o mesmo valor para todas as massas injetadas de cada um dos analitos, pois a curva analítica foi construída com diferentes volumes de injeção da mesma solução. Os valores de  $u_{sol}$ ,  $u_{bal}$  e  $u_{dil}$  foram calculados utilizando a Equação 57, a Equação 58 e a Equação 59, respectivamente.

Os valores de  $u_{mi}$  foram calculados para três níveis de massa introduzida para cada analito, contudo a sua contribuição para o cálculo da  $u_c$  não foi significativa para nenhum dos níveis considerados. A contribuição da incerteza da massa introduzida no

sistema cromatográfico para o primeiro ponto, M1, que representa o menor valor de volume, deveria agregar a maior incerteza combinada. Porém essa contribuição representou valores menores que 5% para todos os analitos. Desta forma, a incerteza da massa introduzida não foi considerada como fonte relevante para o cálculo da  $u_c$ .

Com base nos resultados das incertezas associadas, estimou-se a incerteza combinada ( $u_c$ ) pela Equação 60, usando as fontes relevantes de incerteza, sendo a incerteza expandida ( $U_{k=2; 95\%}$ ) calculada pela Equação 61.

O estudo da incerteza da medição é visualizado com maior clareza quando se calcula o coeficiente de variação, em %. A maior incerteza associada à medição de concentração de analito foi para o primeiro nível M1 dos metabólitos ND e NO<sub>x</sub>, respectivamente, iguais a 11 e 7%. Os demais resultados apresentaram incertezas inferiores a 7%, chegando a 0,3% no nível M9 do EP. Na Tabela 34 são apresentadas as quatro principais componentes de incerteza, as incertezas combinada e expandida dos cinco analitos.

Tabela 34. Incertezas combinadas e expandidas calculadas para as quatro fontes principais de incerteza associadas à medição da concentração GAL e de seus metabólitos.

Fontes de Incertezas		Valores das incertezas				
		NOx	OD	GAL	ND	EP
Curva analítica (sensibilidade em ng <sup>-1</sup> )	$u_m (x 10^{-6})$	1,4	0,4	12,0	82,0	68,9
	$u_b (x 10^{-2})$	1,0	1,3	4,6	34,0	12,2
	$u_{curva}$	0,5	1,1	0,2	0,6	0,2
$u_r$ (ng)	M1	0,3	0,7	2	0,1	0,06
	M7	0,4	3,9	0,1	1,2	0,1
	M9	1,2	2,7	0,4	2,9	0,3
$u_{pi}$ (ng)	M1	0,2	0,4	1,6	0,1	0,03
	M7	0,2	1,7	0,03	1,0	0,06
	M9	0,5	1,0	0,08	1,0	0,03
$u_{fdil}$ (adimensional) (%)		15 (13)	5 (11)	10 (9)	11 (10)	4 (11)
$u_{sol}$ (ng)		0,4	0,2	0,2	0,2	0,1
$u_c$ (ng) (%)	M1	0,7 (9)	1,3 (7)	0,3 (5)	0,7 (11)	0,2 (6)
	M7	0,8 (1)	4,4 (2)	0,3 (0,5)	1,7 (3)	0,3 (1)
	M9	1,4 (1)	2,9 (1)	0,5 (0,4)	3,1 (3)	0,4 (0,4)
$U_{(k=2; 95\%)}$ (ng)	M1	1,4	2,6	0,7	1,3	0,4
	M7	1,6	8,8	0,6	3,4	0,6
	M9	2,8	5,8	1,0	6,2	0,8

M1: NOx (7,9 ng); OD (17,81 ng); GAL (6,03 ng); ND (6,16 ng) e EP (4,0 ng).

M7: NOx (79,04 ng); OD (178,1 ng); GAL (60,3 ng); ND (61,64 ng) e EP (40,0 ng).

M9: NOx (158,08 ng); OD (356,29 ng); GAL (120,7 ng); ND (123,29 ng); EP (80,1 ng).

Na Figura 77, Figura 78, Figura 79, Figura 80 e Figura 81 são mostradas as contribuições das quatro fontes de incertezas, identificadas no diagrama de causa e efeito apresentado no Capítulo 2, para cada um dos cinco analitos estudados, nos três valores de massa, M1, M7 e M9.

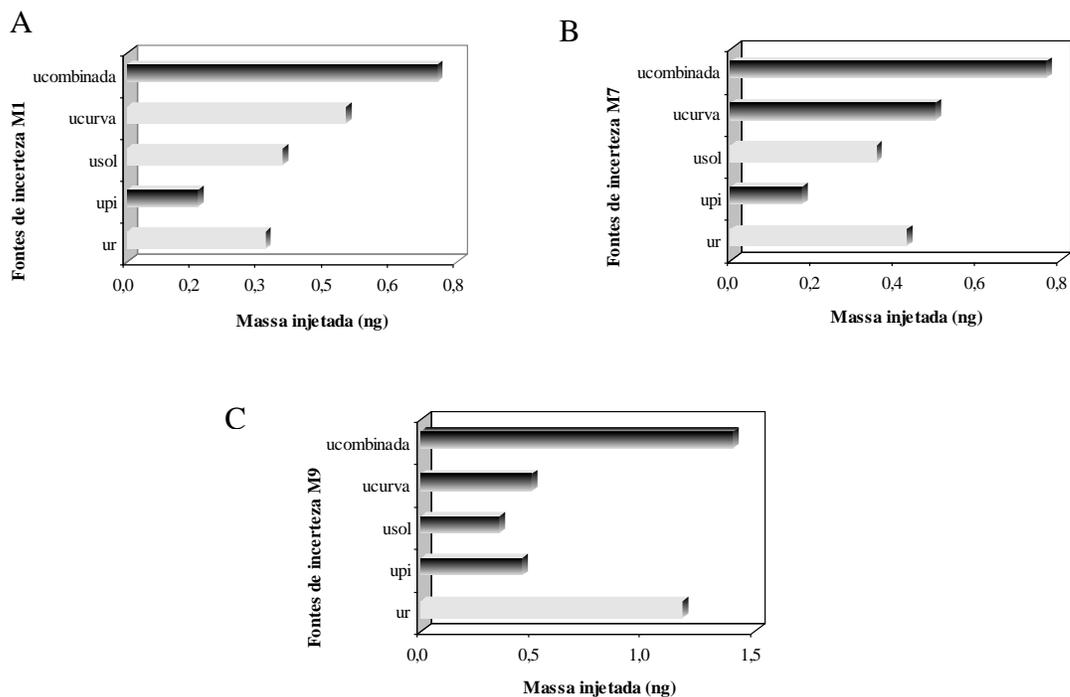


Figura 77. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do NO<sub>x</sub> por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

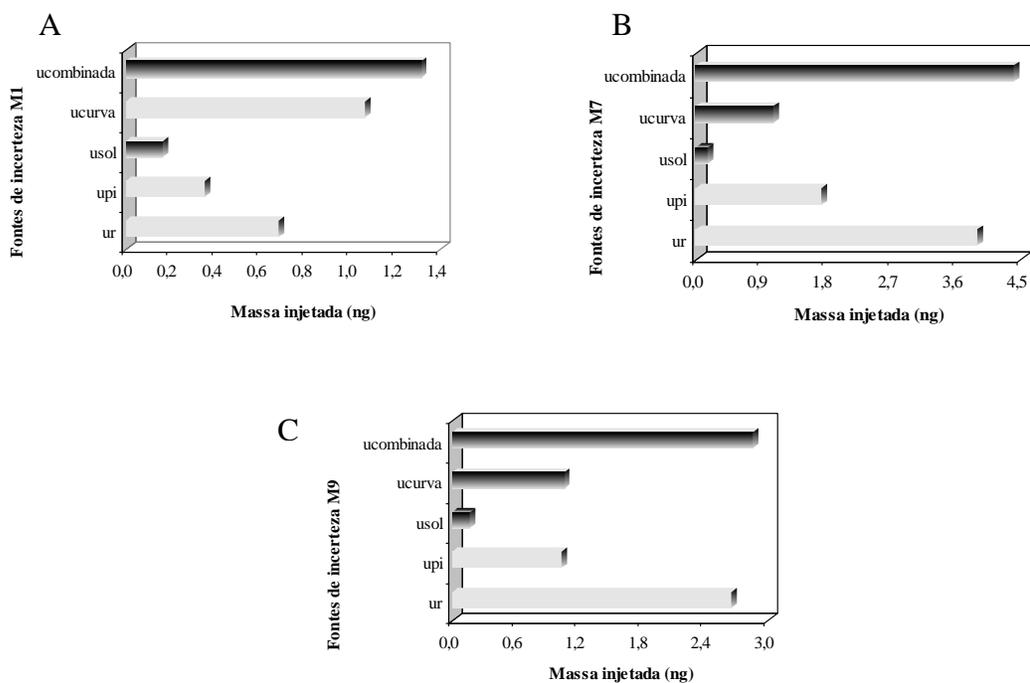


Figura 78. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do OD por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

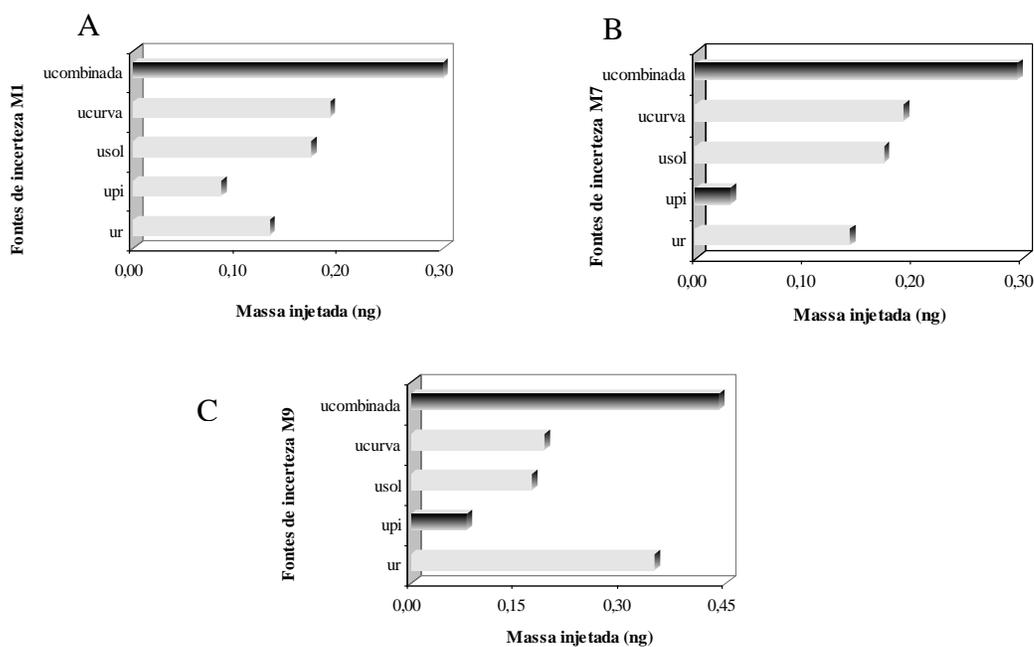


Figura 79. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do GAL por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

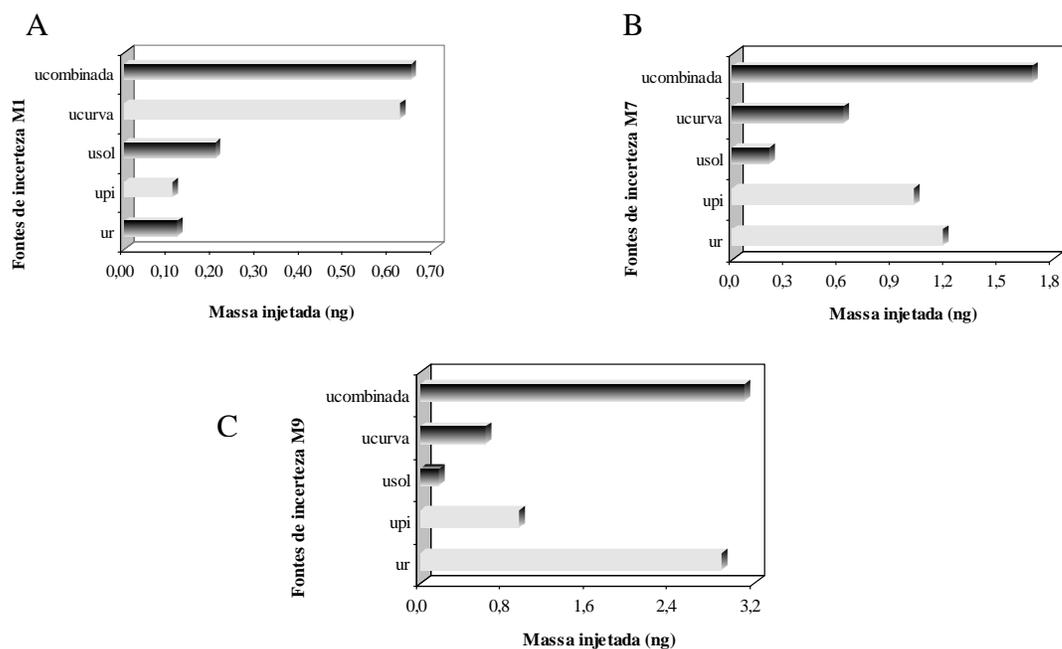


Figura 80. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do ND por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

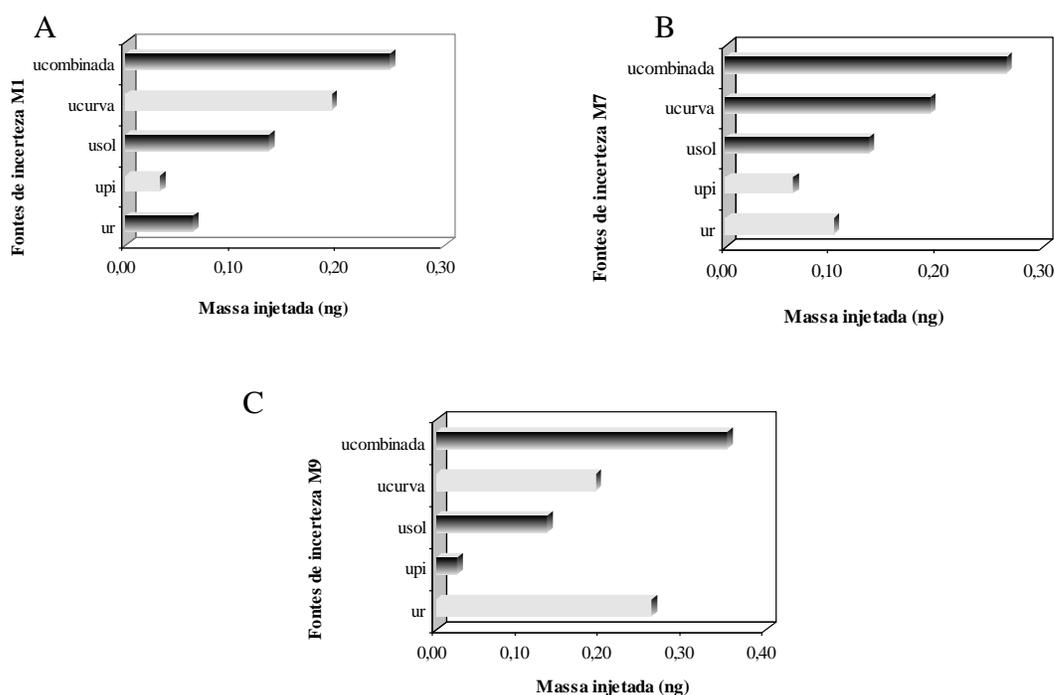


Figura 81. Contribuição relativa das fontes de incertezas da medição em três níveis de concentração do EP por MLC: M1 (A), M7 (B) e M9 (C). Componentes da incerteza:  $u_{curva}$  (curva analítica),  $u_{sol}$  (preparo da solução),  $u_{pi}$  (precisão intermediária) e  $u_r$  (repetibilidade).

Para todos os analitos, a contribuição da incerteza associada à curva analítica foi a mais significativa no cálculo da incerteza combinada referente ao primeiro ponto, M1. Sendo o valor da  $u_{curva}$  o mesmo para todos os pontos ao longo da curva analítica, espera-se que este valor agregará maior incerteza ao menor nível de massa introduzida (M1). A contribuição da incerteza associada à massa em M1 não foi significativa para nenhum dos metabólitos e nem para GAL. O valor da incerteza associada ao preparo da solução,  $u_{sol}$ , teve também uma contribuição significativa para GAL e os metabólitos NOx e EP.

A incerteza combinada,  $u_c$ , para o nível M7 sofreu maior influência da incerteza da repetibilidade para todos analitos, exceto para EP que teve maior contribuição da  $u_{curva}$  e  $u_{sol}$ . Para a GAL, tanto a  $u_{curva}$  quanto a  $u_{sol}$  também contribuem significativamente para a  $u_c$  deste analito.

Para o maior nível de massa de analito introduzido no sistema cromatográfico (M9), a  $u_c$  teve como maior contribuição a repetibilidade,  $u_r$ , no caso de todos os

analitos. Isso pode ser explicado em função do volume introduzido de amostra (100  $\mu\text{L}$ ) na coluna cromatográfica ser o máximo permitido pelo equipamento e, conseqüentemente, a base do pico sofre um maior alargamento, contribuindo assim, para uma maior variabilidade na medida da área sob o pico cromatográfico. Ainda assim, a repetibilidade não ultrapassou 2% (Tabela 33) e a  $u_c$  ficou entre 3 e 0,4% (Tabela 34), dependendo do analito, para esse nível de massa de analito.

Com base nos parâmetros analíticos de mérito e incertezas associadas pode-se dizer que o método de calibração por ajuste de massa introduzida de analito resulta em modelos de comportamento linear (haja vista a menor faixa de trabalho obtida nessa abordagem). Os resultados são precisos sendo uma boa alternativa ao método tradicional de construção da curva analítica, a partir de introdução de volumes iguais de soluções de diferentes concentrações, utilizado no capítulo das  $\beta$ -carbolinas.

A maior vantagem inerente ao método por ajuste de massa injetada é o número mínimo de soluções que o analista deve preparar comparado com o método tradicional. No trabalho das  $\beta$ -carbolinas foram preparadas 27 soluções (réplicas autênticas) para a avaliação dos parâmetros de mérito e incertezas contra cinco (5) réplicas para o método por ajuste de massa de analito introduzida durante a validação do método proposto para GAL e seus metabólitos. A determinação dos limites de detecção e de quantificação utilizando o método por ajuste de massa introduzida de analito é bem mais simples, pois a busca pela menor área detectada pelo método proposto é determinada pela introdução de volumes cada vez menores da mesma solução até atingir o menor pico possível de integração pelo *software* do cromatógrafo. Os valores de LOD e o LOQ são obtidos diretamente em valores absolutos, em massa injetada. Para o método que usa a introdução de volumes iguais de soluções, há a necessidade de preparo de soluções com concentrações cada vez menores, já que o volume de injeção é constante. A desvantagem do método por ajuste de massa é a extensão da faixa de trabalho, que fica dependente da extensão do volume introdução da solução de padrão.

### 5.2.3

#### Teste de interferência

A seletividade do método proposto foi avaliada especificamente para a GAL e os dois metabólitos ND e EP, variando-se a proporção entre estes analitos nas misturas até que não fosse mais possível determinar um analito na presença de outro. Como o par de metabólitos NOx/OD possui uma diferença de tempos de retenção de 4 min e o par de analitos OD/GAL possui uma diferença de 3 min, as interferências mútuas em relação a esses pares não foram consideradas no estudo em função da pouca probabilidade de ocorrerem interferências nas condições de trabalho escolhidas.

Esse estudo seguiu o mesmo procedimento adotado para o teste de interferentes para as  $\beta$ -carbolinas, com a avaliação de misturas contendo proporções diferentes das espécies GAL, ND e EP. Na Tabela 35 são apresentados os valores de massa dos três analitos introduzida no sistema cromatográfico, cobrindo a faixa linear de resposta de cada um deles (sendo a concentração mais baixa o valor do ALOQ de cada um), definindo assim a matriz das misturas usadas no estudo de forma a se ter uma miríade de combinações entre as massas injetadas.

Tabela 35. Valores de massa introduzida no sistema cromatográfico (a partir de 40  $\mu$ L de solução) da GAL, ND e EP utilizadas para a combinação das soluções do teste de interferência.

	GAL	ND	EP
	6,0	6,2	3,9
	12,1	12,3	11,4
Massa injetada	24,1	24,6	19,5
(ng)	48,3	49,2	34,5
	96,6	98,4	69,0
	120,7	123,0	80,1

As proporções dos analitos nas soluções e a ordem de análise (definida aleatoriamente) estão apresentadas na Tabela 36. Cada solução foi analisada em

triplicata (soluções 1 a 24) seguindo a ordenação gerada pelo *software* Excel. Mais quatro misturas (soluções 25 a 28) foram adicionadas ao estudo, com combinações de concentrações extremas, por se julgar necessário inclui-las nas possibilidades de combinação do estudo. As proporções entre os pares dos analitos mais críticos, aqueles com menor resolução (GAL/ND e ND/EP), foram escolhidas de modo a se ter uma maior massa introduzida de um dos analito em relação ao outro do par ou uma relação com os menores e/ou maiores valores de massa introduzida de ambos os analitos do par. As proporções, em massa, de analitos das soluções para cada um desses pares de analitos com menor resolução de separação são indicadas na Tabela 36.

Cada solução (1 a 28) desse estudo foi preparada a partir da diluição das soluções estoques dos analitos de concentração igual a  $12,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de GAL,  $12,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ND e  $10,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  de EP. Para o preparo das soluções foi calculado a concentração final, em  $\text{ng mL}^{-1}$ , de cada analito que correspondesse ao valor de massa injetada para um volume de injeção igual a  $40 \mu\text{L}$ .

Tabela 36. Relação da ordem de análise das misturas contendo GAL, ND e EP e indicação de massa dos analitos introduzida no sistema cromatográfico a partir de 40 µL das misturas e proporção entre as massas introduzidas para os pares GAL:ND e ND:EP.

Número das soluções	Massa introduzida dos analitos, em ng			Razão de massas introduzidas	
	GAL	ND	EP	GAL:ND	ND:EP
1	0,0	123,0	0,0	0:123,0	123,0:0
2	0,0	123,0	11,4	0:123,0	1:0,09
3	0,0	98,4	11,4	0:98,4	1:0,1
4	6,0	24,6	34,5	1:4,1	1:1,4
5	96,6	0,0	80,1	96,6:0	0:80,0
6	0,0	0,0	3,9	–	0:3,9
7	0,0	6,2	19,5	0:6,2	1:3,2
8	48,3	0,0	3,9	48,3:0	0:3,9
9	48,3	24,6	0,0	1:0,5	24,6:0
10	0,0	6,2	3,9	0:6,2	1:0,6
11	0,0	49,2	19,5	0:49,2	1:0,4
12	0,0	24,6	69,0	0:24,6	1:2,8
13	48,3	12,3	80,1	1:0,3	1:6,5
14	0,0	6,2	80,1	0:6,2	1:13,0
15	120,7	12,3	69,0	1:0,1	1:5,6
16	12,1	0,0	0,0	12,1:0	–
17	12,1	98,4	0,0	1:8,2	98,4:0
18	96,6	12,3	19,5	1:0,1	1:1,6
19	120,7	0,0	69,0	120,6:0	0:69,0
20	12,1	49,2	11,4	1:4,1	1:0,2
21	6,0	98,4	0,0	1:16,3	98,4:0
22	96,6	0,00	34,5	96,6:0	0:34,5
23	6,0	123,0	34,5	1:20,4	1:0,3
24	120,7	49,2	0,0	1:0,4	49,2:0
25	120,7	6,2	0,0	1:0,05	6,2:0
26	120,7	123,0	80,1	1:1,0	1:0,6
27	6,0	6,2	3,9	1:1,0	1:0,6
28	0,0	123,0	3,9	0:123,0	1:0,03

O cálculo de massa determinada dos analitos, em ng, foi feito utilizando as equações das curvas analíticas, sendo as recuperações calculadas em função da massa introduzida no sistema cromatográfico. As recuperações que ficaram entre 80 e 120% foram consideradas satisfatórias considerando o nível de concentração destes na mistura (MAPA, 2011) e os resultados relativos aos pares GAL/ND e ND/EP encontram-se na Figura 82. No gráfico, 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 obtidas para os analitos. Os valores das recuperações que ficaram situadas fora da faixa delimitada pelas linhas pontilhadas representam situações nas quais não se pode quantificar um ou até mesmo os dois analitos na mistura com a confiança estabelecida para o teste. Isso ocorreu quando a presença de um analito em uma mistura, num nível de massa específico, interfere na medida da área sob o pico cromatográfico do outro analito, causando uma interferência positiva (acima de 120%) ou negativa (abaixo de 80%) na quantificação deste analito. Na Figura 82 podem ser observadas as recuperações alcançadas para o par GAL/ND e para o par ND/EP nas 28 misturas testadas, levando-se em consideração as proporções entre GAL:ND e ND:EP.

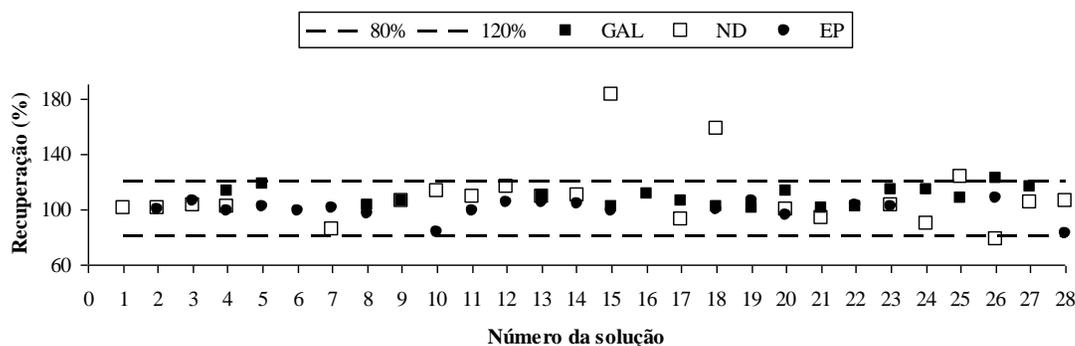


Figura 82. Recuperações obtidas para o par de analitos (■) GAL/(□) ND e (□) ND/(●) EP. Linhas pontilhadas (----): limite inferior de 80% e limite superior de 120%.

A diferença entre os tempos de retenção do par GAL/ND, nas condições experimentais escolhidas, foi igual a 1,7 min e a diferença para o par ND/EP foi de 2,0 min. Sendo o par de GAL/ND, o de menor resolução do estudo, esperava-se uma

faixa mais restrita de proporção de massa introduzida para a qual não se observaria interferência na quantificação dos mesmos.

A recuperação para GAL na solução 26 (proporção GAL:ND igual a 1:1,0) ficou acima do limite superior de 120%, enquanto a recuperação para o metabólito ND ficou abaixo do limite inferior de 80%. Essa solução possui a maior relação entre as massas injetadas para GAL (120,7 ng) e ND (123,0 ng) dentro da faixa linear estabelecida (Tabela 6). Pode se concluir que os resultados não satisfatórios da solução 26 para o par GAL/ND advém da elevada concentração dos analitos, o que acarreta em uma maior largura dos picos e, conseqüentemente, uma maior interferência na medida da integração das áreas. É interessante notar que a solução 27 possui a mesma razão das massas injetadas para o par GAL/ND, mas suas recuperações foram satisfatórias, ficando dentro do limite de confiança estabelecido, pois nessa solução se tinha a menor relação entre as massas introduzidas de GAL (6,0 ng) e de ND (6,2 ng), resultando em picos com maior eficiência e, portanto, mais resolvidos. Desta forma, a integração das áreas não sofre interferência mútua significativa. Conforme discutido, a razão limite de quantificação deve ser analisada juntamente com a magnitude da massa introduzida dos analitos presentes na mistura, pois a interferência de um analito sobre o outro pode ser diferente em proporções iguais.

Além da solução 26, as soluções 15 (proporção 1:0,1), 18 (proporção 1:0,1), 25 (proporção 1:0,05) também tiveram as recuperações para o metabólito ND insatisfatórias e acima do limite de 120%. Provavelmente, isso está associado às proporções mais elevadas da GAL nas misturas, promovendo a interferência no pico do ND, presente em pequenas quantidades.

Todas as recuperações para o metabólito EP foram satisfatórias. Isso significa que a distância entre os tempos de retenção (2 min) dos picos do par ND/EP é suficiente para esses analitos não sofrerem interferência mútua.

Com base nos resultados encontrados, para a quantificação satisfatória do par GAL/ND a proporção limite deve ser 1:0,4 (solução 24), que possui elevada massa introduzida da GAL (120,7 ng) e massa introduzida de ND 2,5 vezes menor (49,2 ng). Além desse limite estabelecido para valores de massa superiores, a situação

limite para a quantificação do ND, quando este está presente em menores níveis de massa introduzida, é a da mistura 18, onde a quantificação de pequenas quantidades de massa introduzida para esse metabólito (entre 6,2 e 12,3 ng) é prejudicada quando há a presença de quantidade elevada da GAL (entre 96,6 e 120,7 ng) na mistura.

#### 5.2.4

#### Ensaio de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados em amostra de urina obtida de um voluntário sadio. A amostra de urina foi fortificada, logo após a sua coleta, com soluções padrões da GAL e de seus quatro metabólitos e tratadas segundo o procedimento de *clean up* já descrito. A amostra fortificada foi diluída na proporção igual a 1 parte de amostra para 1,5 parte de solução de idêntica à fase móvel e introduzidas, variando o volume de injeção, no sistema cromatográfico nas condições experimentais estabelecidas para o método MLC. As concentrações finais dos analitos na amostra de urina foram: 1,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NOx, 3,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OD, 1,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GAL, 1,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ND e 0,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de EP. Três réplicas autênticas da amostra de urina fortificada foram preparadas.

A recuperação foi avaliada em três níveis distintos de massa introduzida, indicados como M1, M2 e M3, na faixa de trabalho do método e respeitando a proporção limite de massas para o par dos analitos GAL/ND determinado nos testes de interferência, variando os volumes de injeção em 6, 30 e 60  $\mu\text{L}$  (Tabela 37).

Tabela 37. Valores de massa introduzida de analito a partir da amostra de urina fortificada com soluções padrões de GAL e de seus metabólitos<sup>1</sup>.

Nível de massa introduzida	Volume de amostra introduzida (µL)	Massa introduzida dos analitos (ng)				
		NOx	OD	GAL	ND	EP
M1	6	9,5	21,4	7,3	7,4	5,2
M2	30	47,4	106,9	36,3	37,0	26,1
M3	60	94,9	213,8	72,6	74,0	52,2

<sup>1</sup>NOx (1,6 µg mL<sup>-1</sup>), OD (3,6 µg mL<sup>-1</sup>), GAL (1,2 µg mL<sup>-1</sup>), ND (1,2 µg mL<sup>-1</sup>) e EP (0,9 µg mL<sup>-1</sup>).

Na Figura 83 são apresentados os cromatogramas obtidos para o nível M2 de massa introduzida de amostra de urina fortificada com os analitos (volume de injeção de 30 µL) utilizando o método proposto por MLC nas condições estabelecidas. Um ensaio de branco com a introdução da amostra de urina sem a fortificação também foi realizado assim como um cromatograma de solução padrão de GAL e seus metabólitos para efeito de comparação. Na Tabela 38 são apresentados os valores das recuperações e os respectivos coeficientes de variação.

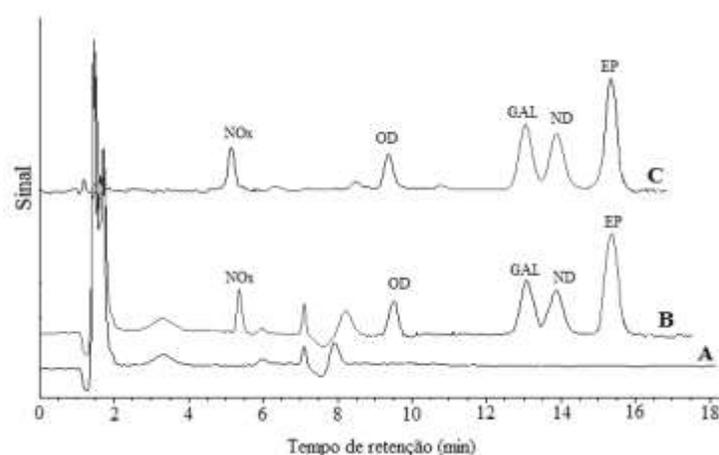


Figura 83. Superposição de cromatogramas obtidos pela introdução de amostra de urina voluntário (ensaio em branco) (A), de amostra de urina fortificada com os analitos (nível M2) (B) e de uma solução padrão dos analitos (C). As concentrações finais dos analitos nos cromatogramas B e C foram: NOx (1,6 µg mL<sup>-1</sup>), OD (1,2 µg mL<sup>-1</sup>), GAL (1,2 µg mL<sup>-1</sup>), ND (1,2 µg mL<sup>-1</sup>) e EP (0,9 µg mL<sup>-1</sup>). Volumes introduzidos de 30 µL e condições experimentais indicadas na Tabela 37.

Tabela 38. Valores de recuperação percentual dos analitos na amostra de urina fortificada com GAL e seus metabólitos.

Nível de massa introduzida	Recuperações (%)				
	NOx	OD	GAL	ND	EP
M1	94,8 ± 2,1	96,8 ± 1,0	96,8 ± 3,0	91,7 ± 1,0	98,6 ± 0,6
M2	102,3 ± 2,7	91,8 ± 2,1	110,9 ± 1,2	100,0 ± 2,0	100,2 ± 1,9
M3	114,8 ± 1,2	91,4 ± 1,4	101,9 ± 3,7	101,1 ± 3,8	100,2 ± 0,8

Os valores de recuperação obtidos para os cinco analitos, em amostra de urina foram satisfatórios, ficando entre 91,4 e 114,8 % com coeficientes de variação de menos de 4% para a triplicata analisada. A comparação de tempos de retenção dos analitos da amostra e no padrão permitiu a identificação dos picos dos analitos de interesse. Nos cromatogramas com urina, entre 7 e 8 min, foram observados mais dois picos de componentes não identificados da matriz da amostra.

### 5.2.5

#### Comparação entre métodos

Para comparar o desempenho do método proposto na quantificação da GAL, foi utilizado o método de autoria de Zhang et al. (2007) que é baseado no uso da cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa e detecção fluorimétrica. O trabalho foi escolhido, pois o LEEA-PUC-Rio, onde foi desenvolvida a Tese, dispunha de todos os reagentes e equipamentos necessários para a execução deste método. Nas condições experimentais reproduzidas para o método por HPLC, o tempo de retenção da GAL foi 5,2 min. Na Tabela 39 são mostradas as condições experimentais utilizadas na determinação da GAL pelo método baseado no HPLC com fase reversa.

Tabela 39. Condições experimentais utilizadas para a quantificação da GAL usando HPLC com detecção fluorimétrica.

Condições experimentais	
Coluna cromatográfica	Zorbax C18 4,6x150 mm, diâmetro das partículas 5µm
Solução aquosa contendo 1% de (Et) <sub>3</sub> N e 20% de ACN (v/v). O pH	
Composição da fase móvel	7 foi ajustado com solução de HCl.
Eluição	Isocrática
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	1,0
Temperatura da coluna (°C)	30
Volume de injeção (µL)	20
λ <sub>exc/em</sub> , em nm	290/320
Detecção	Fluorimétrica

Na Figura 84 estão apresentados os cromatogramas obtidos pela introdução de uma solução de GAL (na concentração de 11,5 µg mL<sup>-1</sup>) por HPLC de fase reversa e por MLC. Os pares de comprimentos de onda de excitação e de emissão, λ<sub>exc/em</sub>, para determinação da GAL foram 290/320 nm para HPLC e 285/330 nm para MLC.

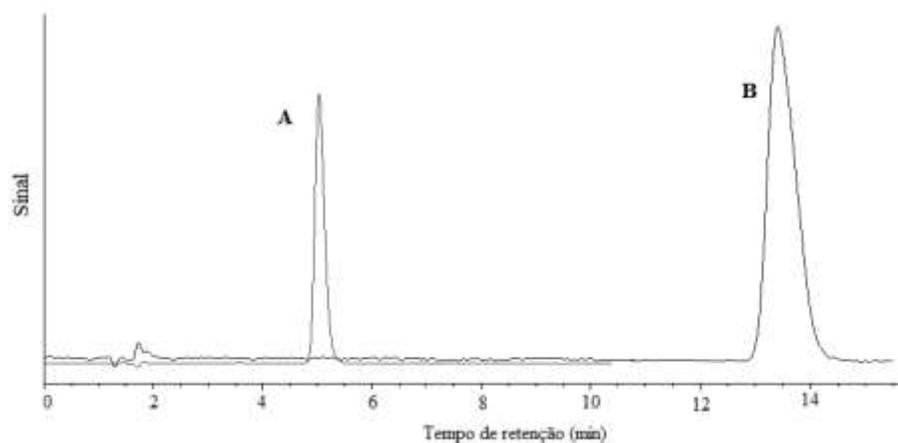


Figura 84. Cromatogramas obtidos pela introdução da solução de GAL (11,5 µg mL<sup>-1</sup>): por HPLC de fase reversa em fase móvel composta por solução aquosa contendo (Et)<sub>3</sub>N (1%) e ACN (20%) e pH 7 (A) com vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 30°C; por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

Os tempos de retenção da GAL foram de 5,2 min por HPLC e 13,5 min por MLC. Essa diferença pode ser explicada pelas forças de interação distintas que governam o mecanismo de retenção da GAL protonada em ambos os casos. Em MLC, ocorre uma interação eletrostática da GAL (carregada positivamente em pH 5,0) com a fase estacionária modificada pelos monômeros de SDS, carregados negativamente. Em HPLC de fase reversa, o mecanismo de retenção da GAL protonada em fase estacionária C18 será governado por interações hidrofóbicas, que são mais fracas que as interações eletrostáticas em MLC. O perfil do pico cromatográfico da GAL obtido por HPLC de fase reversa é mais fino do que o pico resultante por MLC. Essa observação pode ser relacionada com a lenta transferência de massa que ocorre em sistemas cromatográficos em meio micelar. Além disso, pode se observar que a linha de base obtida por MLC apresenta maior ruído comparada com o método por HPLC de fase reversa. A presença de micelas na fase móvel pode produzir cavidades na fase móvel devido à detergência do surfactante, podendo resultar em um aumento da oscilação da linha base e, por conseguinte, do ruído. Outra fonte de ruído pode ser atribuída à absorção de fundo das impurezas presentes no SDS elevando a linha base, principalmente, quando a região de comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizada no método coincide com os valores onde as impurezas do sal de SDS fluorescem, como é o caso da GAL. Em consequência, a relação sinal-ruído para o método proposto por MLC é superior ao método por HPLC, repercutido no valor do LOD e LOQ para a determinação de GAL por MLC.

A quantificação da GAL alcançada pelo método por HPLC foi apenas a partir de 2,2 ng de massa injetada, sendo esse valor discrepante do valor absoluto do LOQ absoluto (0,02 ng) determinado por Zhang et al. (2007). Provavelmente, a discrepância entre os valores absolutos do LOQ se deve a diferença no método de determinação do limite. O LOQ foi determinado pelos autores baseado em três vezes a razão sinal/ruído do branco e o LOD não foi determinado. Para a comparação entre os métodos, o LOD e o LOQ foram determinados para o método por HPLC utilizando o mesmo procedimento adotado, descrito no Capítulo 2, para as  $\beta$ -carbolicinas e para GAL e os metabólitos, o qual se baseia na injeção de soluções padrão do analito em

concentrações cada vez menores até que não seja mais possível a integração do pico pelo *software*.

A faixa de trabalho de GAL utilizada na comparação entre métodos foi de 11,5 a 1149,4 ng a partir da introdução de diferentes volumes de um padrão analítico (1 a 100  $\mu\text{L}$ ). Soluções de GAL a  $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas em triplicata, em réplicas autênticas, e injetadas no sistema cromatográfico para cada método. Na busca de maior confiabilidade nos resultados, os métodos por MLC e por HPLC foram reproduzidos utilizando o mesmo cromatógrafo líquido e colunas cromatográficas de mesmas características, como dimensão e porosidade. As medidas, em ambos os métodos, foram realizadas no mesmo dia a fim de evitar que o resultado fosse afetado pela variação da radiância da fonte de excitação do cromatógrafo.

A faixa de massa injetada, em ng, foi ampliada, pois os métodos foram comparados pelo teor de GAL presente em um medicamento contendo quantidades elevadas do princípio ativo hidrobrometo de galantamina. Desta forma, evitaria medir quantidades muito pequenas de massa de medicamento além de sucessivas diluições, minimizando as incertezas na medida do teor e, conseqüentemente, na comparação entre os resultados.

Os valores de LOD e LOQ e os respectivos ALOD e ALOQ, as equações das curvas analíticas e o valor de  $R^2$  ajustado para ambos os métodos estão mostrados na Tabela 40. Pode ser observado que a curva analítica obtida para GAL pelo método por MLC é mais sensível, com coeficiente angular da curva obtida por MLC é 1,8 vezes maior que por HPLC. Em contrapartida, os valores de LOD e LOQ obtidos para o método por HPLC foram menores em 2,7 vezes em comparação aos obtidos com o método por MLC. Uma justificativa para isso é o aumento do ruído da linha de base causado pelo sistema micelar.

Tabela 40. Valores de faixa de trabalho, em valores de massa introduzida de GAL, equações das curvas analíticas e valores de  $R^2$  para o método proposto por MLC e para o método por HPLC.

Parâmetros analíticos	MLC	HPLC de fase reversa
LOD ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	92,5	37,5
ALOD (ng)	3,7	1,5
LOQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	147,5	55,0
ALOQ (ng)	5,9	2,2
Faixa de trabalho (ng)	11,5 a 1149,4	
Equação da curva analítica (sensibilidade em $\text{ng}^{-1}$ )	$y = 0,55 x + 0,97$	$y = 0,31 x - 0,33$
$R^2_{\text{ajustado}}$	0,99	0,99

A diferença de sensibilidade das respostas analíticas pode ser constatada pelas curvas analíticas construídas para cada método, como indicado na Figura 85.

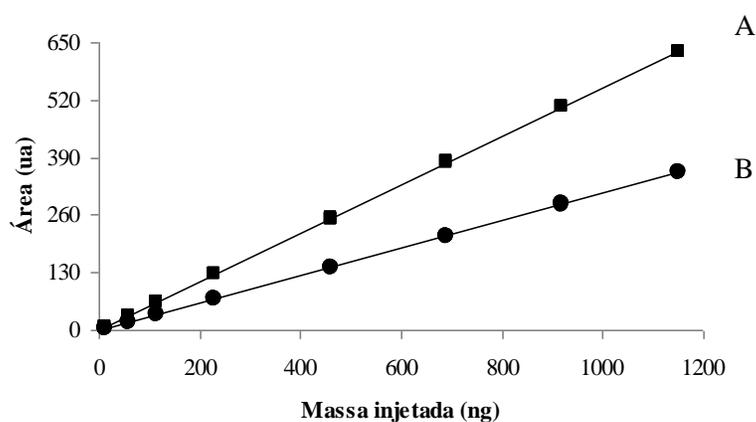


Figura 85. Curva analítica construída para GAL (A) em MLC e (B) em HPLC por fase reversa.

Para comparar os métodos foram utilizadas amostras do medicamento cujo princípio ativo era o hidrobrometo de galantamina. Três cápsulas do medicamento (massa média de cada cápsula 0,09678 g) foram maceradas e misturadas. Cinco massas do medicamento na faixa de 3,1 a 3,5 mg foram diluídas em metanol para o preparo das cinco réplicas autênticas. As soluções resultantes foram diluídas na proporção igual a 1 parte de amostra para 4 partes de solução idêntica à fase móvel de cada método e introduzidas no sistema cromatográfico.

As massas introduzidas foram calculadas pelas equações da reta (Tabela 40), a partir dos valores das áreas obtidas pela integração dos picos cromatográficos e, o teor (razão entre a massa da GAL e a massa do medicamento) foi calculado comparar os métodos. O desvio padrão e o coeficiente de variação (CV %) estão apresentados na Tabela 41 com o respectivo valor do teor, em %.

Tabela 41. Teores de GAL obtidos pelo método proposto por MLC e pelo método por HPLC em amostra do medicamento contendo hidrobrometo de galantamina.

Número da solução	Teor de GAL (%)	
	MLC	HPLC
1	12,7	12,7
2	12,9	12,7
3	12,8	12,6
4	12,5	12,4
5	12,6	12,5
Média	12,7	12,6
Desvio padrão	0,2	0,1
CV (%)	1,3	1,0

Para fins comparativos, as médias dos teores obtidos pelos métodos por MLC (12,7) e por HPLC (12,6) foram comparadas com o teste t bi-caudal presumindo variâncias iguais (Tabela 42). Os valores em **negrito** representam, respectivamente, os resultados dos testes  $t_{\text{calculado}}$ , **valor-p** e  $t_{\text{crítico}}$ .

Tabela 42. Teste t bi-caudal presumindo variâncias equivalentes para os teores de GAL em medicamento contendo hidrobrometo de galantamina e determinados por MLC e por HPLC.

	MLC	HPLC
Média	12,70	12,56
Variância	0,027	0,0145
Gl (grau de liberdade)		8
$t_{\text{calculado}}$		1,52
<b>valor-p</b>		0,17
$t_{\text{crítico}}$ bi-caudal		2,31

Para os testes, os valores de  $t_{\text{calculado}}$  (1,52) foram menores que  $t_{\text{crítico}}$  (2,31), para 95% de confiança. Diante desses resultados, pode se afirmar que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto por MLC e o método de comparação, por HPLC.

O valor do desvio padrão para MLC foi similar ao método por HPLC, obtendo-se CV de 1,3% contra 1,0% para o HPLC. Paralelamente, foi realizada uma comparação entre as variâncias obtidas por ambos os métodos (Tabela 43), utilizando ANOVA com fator único. Os valores em negrito representam, respectivamente, os resultados dos testes  $F_{\text{calculado}}$ ,  $F_{\text{crítico}}$  e valor-p.

Tabela 43. Valores resultantes da Análise de Variância: fator único, para a medida de teor de GAL em medicamento contendo o hidrobrometo de galantamina por MLC e por HPLC.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	$F_{\text{calculado}}$	valor-p	$F_{\text{crítico}}$
Entre grupos	0,048	1	0,048			
Dentro dos grupos	0,16	8	0,021	<b>2,33</b>	<b>0,17</b>	<b>5,32</b>
Total	0,21	9				

Com base nos resultados obtidos pela ANOVA, pode se concluir que não há uma diferença significativa entre as variâncias das medidas obtidas por MLC e por HPLC convencional.

### 5.2.6

#### Aplicação da metodologia em urina de ratos

O método proposto por MLC foi aplicado na análise de urina de três ratos machos da linhagem albina *Wistar*, com idade de 2 a 3 meses, após a injeção de uma solução do medicamento contendo o princípio ativo hidrobrometo de galantamina. Esse experimento foi feito para avaliar se o método proposto era capaz de determinar quantidades da GAL e seus principais metabólitos numa amostra biológica real.

O medicamento controlado o qual contém o hidrobrometo de galantamina é indicado para o tratamento de Alzheimer. Cada cápsula de liberação prolongada

contém o equivalente a 10,25 mg de hidrobrometo de galantamina, que é equivalente a 8 mg de GAL, conforme descrito na bula do medicamento. Uma massa equivalente a 10,60 mg do medicamento foi dissolvida em 5,00 mL de soro fisiológico para a injeção nos ratos. Cada animal recebeu uma dosagem de aproximadamente 0,5 mL da solução do medicamento.

As amostras de urina dos ratos foram coletadas antes da administração do medicamento para se obter material para o ensaio em branco da amostra. Após a injeção do medicamento a coleta ocorreu imediatamente após a excreção da urina pelos ratos ao longo de 2 h. As amostras – antes e após a administração do medicamento – foram tratadas seguindo o procedimento de *clean-up* já descrito e depois diluídas na fase móvel micelar de composição escolhida para o método, na proporção igual a 1 parte de amostra para 4 partes de solução idêntica à fase móvel.

Para a identificação dos picos originais da GAL e de seus metabólitos na urina dos ratos, coletadas após a administração do medicamento, preparou-se a amostra fortificada com a solução padrão dos analitos seguindo o mesmo procedimento de tratamento citado. As concentrações finais na solução amostra fortificada, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram iguais a NOx (1,58), OD (1,15), GAL (1,21), ND (1,23) e EP (0,87) com massas dos analitos introduzidas no sistema cromatográfico (40  $\mu\text{L}$  da amostra) foram: NOx (63,2 ng), OD (46 ng), GAL (48,4 ng), ND (49,2 ng) e EP (34,8 ng). Na Figura 28 foram superpostos os cromatogramas obtidos pela injeção da solução amostra de urina antes da administração do medicamento, solução amostra coletada 2 h após a administração do medicamento e amostra coletada após a administração do medicamento e fortificada com os padrões dos analitos. Os cromatogramas foram editados de forma que os picos referentes aos analitos ficassem em evidência, desta forma, os picos iniciais relativos a outros componentes da matriz foram cortados. No cromatograma da solução amostra é possível observar a presença de três picos de tempo de retenção igual a 5,5 min, 13,6 min e 14,7 min, coincidentes com os tempos de retenção do NOx, GAL e ND, respectivamente. Para confirmar a presença dos analitos, foi analisada a amostra de urina fortificada com uma solução padrão dos analitos e os tempos de retenção comparados. Observou-se o aumento da intensidade do sinal do pico relativo aos metabólitos NOx e ND e o princípio ativo, GAL, sendo

possível afirmar a presença desses analitos na amostra de urina após a medicação dos ratos com a solução do medicamento. Não foram identificados os metabólitos, OD e EP.

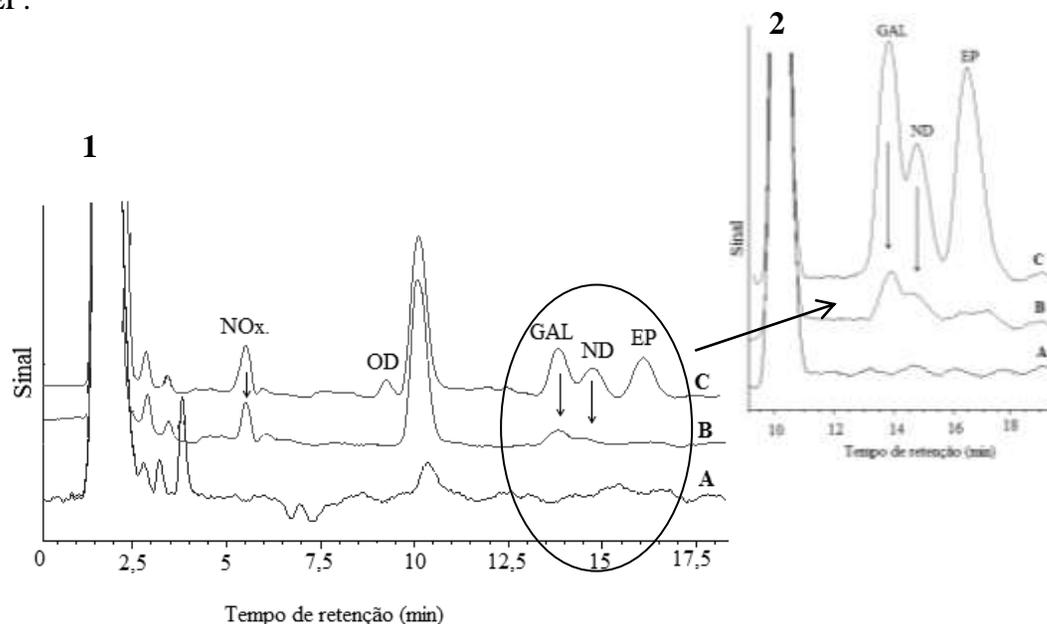


Figura 86. 1) Cromatogramas obtidos pela introdução da solução amostra de urina antes da administração do medicamento (A), solução amostra de urina coletada 2 h após a administração do medicamento (B) e solução amostra de urina coletada 2 h após administração do medicamento fortificada com os analitos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

A concentração e o desvio padrão, em ng, dos analitos na amostra ( $n = 3$ ) foram calculados. A massa encontrada para o metabólito NOx foi igual a  $206,58 \pm 0,40$  ng, para a GAL a massa foi de  $23,96 \pm 0,90$  ng e para o ND a massa obtida foi  $17,4 \pm 1,5$  ng. Pelos cálculos de diluição, estima-se que em 2,00 mL de volume total coletado da amostra de urina continha o equivalente a 51,6  $\mu\text{g}$  de NOx, 6,0  $\mu\text{g}$  de GAL e 4,3  $\mu\text{g}$  de ND. De acordo com as quantidades do princípio ativo em cada cápsula, informada pela bula do fabricante, estima-se que cada rato recebeu o equivalente a 87,62  $\mu\text{g}$  de GAL. A via de metabolização predominante da GAL pelos ratos foi a formação do *N*-óxido galantamina, NOx, provavelmente, pela citocromo CYP3A4 responsável por pela formação desse metabólito (Maláková et al., 2007).

### 5.3

#### **Estudos do Fator de Enriquecimento Micelar do Sinal Fluorescente da galantamina**

Cada vez mais, métodos seletivos e sensíveis e técnicas de enriquecimento de sinal fluorescente, são estudados para a quantificação de muitas substâncias, como as aflatoxinas presentes em pimentas, grãos, cervejas, dentre outros alimentos (Goryacheva et al., 2008). Uma estratégia para o ganho de intensidade do sinal fluorescente de substâncias que exibem baixa fluorescência é o uso de meios organizados, tais como ciclodextrinas e micelas. As micelas são capazes de isolar moléculas em suas regiões anfifílicas, alterando o microambiente da molécula e, em muitos casos, a intensidade luminescente melhora (Pelizzeti e Pramauro, 1985). Segundo Culzoni et al. (2010), a GAL possui um baixo sinal fluorescente não sendo possível a quantificação desse fármaco em baixas concentrações ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) que é o esperado de se encontrar em amostras ambientais de água. Dentre os meios organizados que foram testados, vários tipos de micelas e ciclodextrinas, as micelas de SDS foi o meio organizado que resultou em um maior fator de enriquecimento micelar (MEF) da GAL, seis vezes, medido no espectrofluorímetro.

Com o intuito de determinar o ganho de sinal fluorescente para GAL em meio micelar de SDS foi avaliado em três sistemas distintos: (i) por espectrofluorimetria e (ii) adição pós-coluna de solução micelar em cromatografia líquida de fase reversa. Para os dois sistemas o ganho de sinal foi avaliado utilizando apenas a GAL.

#### **5.3.1**

##### **Determinação do fator de enriquecimento de sinal da GAL no meio rico em micelas de SDS por espectrofluorimetria**

O aumento da fluorescência da GAL em meio rico em micelas de SDS foi calculado usando espectrofluorimetria com medição da solução estacionária na cubeta. Para tal, a razão entre as intensidades de sinal da GAL dissolvida em meio

rico em micelas de SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e em meio sem SDS foi obtida. A concentração da GAL foi  $0,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e a solução aquosa contendo tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0). A fluorescência das soluções em branco (sem a presença da GAL) foram medidas com o intuito de corrigir o sinal do branco das soluções da GAL nos meios estudados.

Na Figura 87 são mostrados os espectros de fluorescência da GAL medidos em meio aquoso tamponado (pH 5,0) na presença e na ausência de micelas de SDS. Como pode ser observado, houve um aumento significativo da fluorescência da GAL em meio rico em micelas de SDS (espectros C e D) em relação ao meio sem SDS (espectros A e B). Isso mostra que a eficiência quântica da GAL é melhorada em função da organização do meio, aumentando a rigidez do analito e minimizando colisões que aumentam a taxa de desativação não radiante das moléculas de GAL no estado excitado.

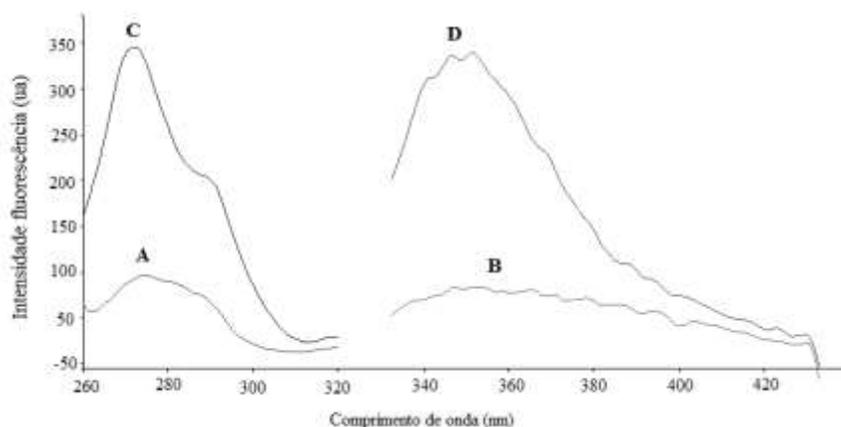


Figura 87. Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de uma solução de GAL ( $0,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) medidos em meio aquoso contendo tampão acetato (pH 5,0) e espectros de excitação (C) e emissão (D) de fluorescência de uma solução de GAL ( $0,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$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

A intensidade de sinal para GAL em meio rico em micelas de SDS, após a correção do sinal do branco (sinal líquido) foi igual a 288,7 unidades de luminescência (LU) enquanto que em meio aquoso, o sinal líquido obtido foi 71,5 LU. Assim, o valor do MEF (*Micelar Enhancement Factor*) medido por espectrofluorimetria foi de quatro vezes.

### 5.3.2

#### **Determinação do fator de enriquecimento de sinal da GAL no meio rico em micelas de SDS em regime de vazão**

A determinação do MEF para a GAL em regime de vazão de fase móvel no sistema cromatográfico foi avaliada por meio da adição de solução micelar de SDS, em concentração acima da CMC, na fase móvel após a passagem da zona da GAL pela coluna cromatográfica.

As condições experimentais escolhidas inicialmente foram baseadas nas condições do método por MLC para determinar a GAL, com exceção da quantidade de ACN (escolhida com base no método para a determinação da GAL por HPLC de fase reversa), ou seja, com fase móvel com tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) ( $\text{Et}_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (80/20% v/v). A solução micelar adicionada após a coluna cromatográfica era constituída por tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ( $\text{Et}_3\text{N}$  (0,5%). A concentração de SDS de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  foi escolhida para garantir que mesmo após a mistura com o eluente proveniente da coluna, na mola de reação, a solução final tivesse valores de SDS acima da CMC. O experimento foi realizado com sistema contendo uma coluna cromatográfica C18 com  $120 \text{ \AA}$  de porosidade e mantida a  $25^\circ\text{C}$ . O volume introduzido de solução padrão foi  $40 \text{ }\mu\text{L}$  e a detecção da foi em  $285/330 \text{ nm}$ , já que os experimentos no fluorímetro mostraram que a presença de micelas de SDS não causa mudança significativa nos máximos do espectro de fluorescência da GAL.

A vazão de fase móvel que carrega a zona da amostra foi mantida pela bomba principal passando pela coluna cromatográfica, enquanto que a solução micelar foi introduzida diretamente para a mola de reação pela bomba secundária. Para se obter uma boa mistura entre a fase móvel e a solução micelar de SDS na mola de reação foi necessário otimizar a vazão das bombas de modo a se ter o menor ruído da linha de base e o maior aumento de fluorescência da GAL. Inicialmente, foi testado uma relação entre as vazões de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  para a bomba principal e  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  para a secundária, com o intuito de obter uma vazão total igual a  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Na Figura 88 são mostrados os cromatogramas obtidos com a introdução de uma

solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) diluída em composição idêntica à da fase móvel aquosa e pelo respectivo ensaio em branco.

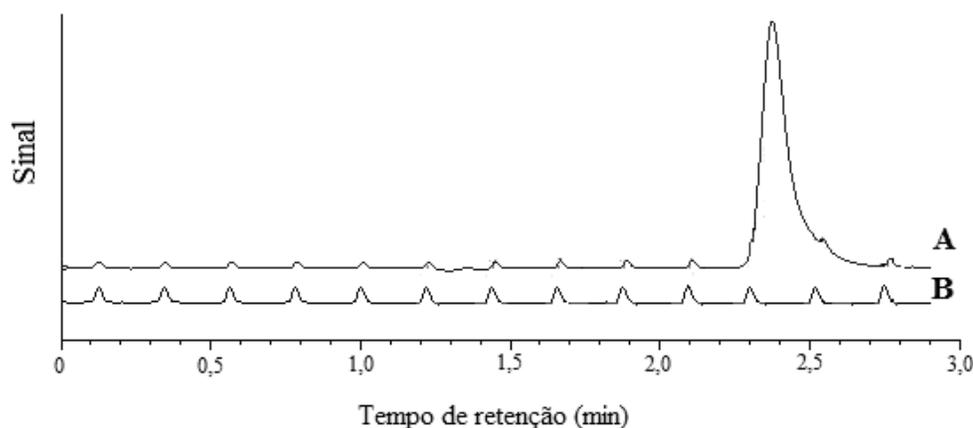


Figura 88. Cromatogramas obtidos com a introdução de solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (A) e o respectivo ensaio em branco (B) no experimento de adição de fase móvel micelar após a coluna cromatográfica. Fase móvel principal contendo tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) e 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

Na relação de vazão testada, os cromatogramas apresentaram ruído provavelmente devido ao distúrbio provocado pela adição da solução micelar e que provocaram a formação bolhas na fase resultante. Para minimizar a formação de bolhas por efeito da cavitação durante a mistura das soluções na mola de reação, adicionou-se propan-2-ol tanto na fase móvel principal quanto na solução micelar. Na Figura 89 são mostradas as linhas de base obtidas após a mistura das soluções na mola de reação nas condições indicadas no experimento anterior e também com as ambas soluções contendo 2% de propan-2-ol. Observa-se que o nível do ruído e a oscilação periódica (que ocorre provavelmente na frequência do pistão da bomba) reduziu significativamente com a adição de propan-2-ol (v/v), provavelmente por causa da inibição de formação de bolhas que espalham a radiação incidente.

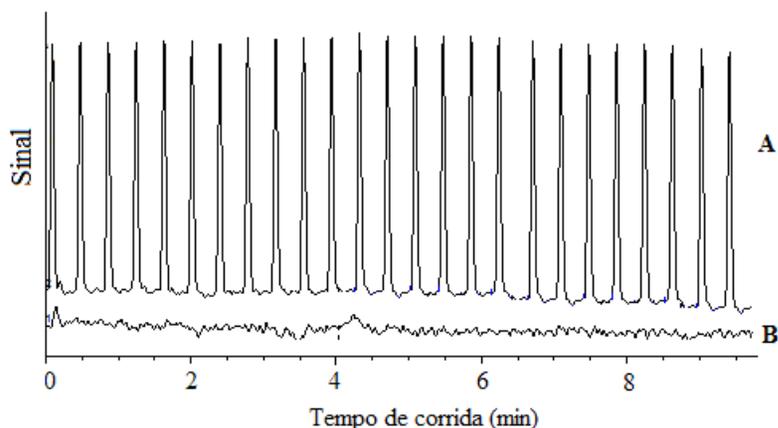


Figura 89. Linhas de bases obtidas com a mistura da fase móvel com a solução rica em micelas de SDS na ausência de propan-2-ol em ambas as soluções (A) e na presença de 2% de propan-2-ol em ambas as soluções (B). Fase móvel consistindo de solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%)/ACN (80/20% v/v) e solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%). A relação da vazão das bombas principal/vazão de solução rica em micelas de SDS foi igual a 0,8/0,2  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em 285/330 nm.

Após a redução do ruído com a estabilização da fase móvel um estudo foi feito para se encontrar relação entre a vazão da fase móvel/ vazão de solução rica em micelas ( $0,8/0,2 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $0,8/0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $0,5/0,5 \text{ mL min}^{-1}$  e  $0,5/1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) que produziria o melhor resultado (Figura 90).

Com o aumento da vazão da bomba secundária, a que alimenta a mola de reação com a solução rica em micelas de SDS, para valores iguais ou superiores a vazão da bomba principal, o ruído foi minimizado. Assim, pode-se concluir que com a elevação da vazão da bomba secundária, a mistura entre a fase móvel e a solução micelar provocou um menor distúrbio na solução resultante, minimizando a formação de bolhas. As razões iguais a  $0,5/0,5$  e  $0,5/1,0 \text{ mL min}^{-1}$  produziram os menores níveis de ruído, sendo a razão  $0,5/1,0 \text{ mL min}^{-1}$  a condição escolhida para continuidade dos experimentos.

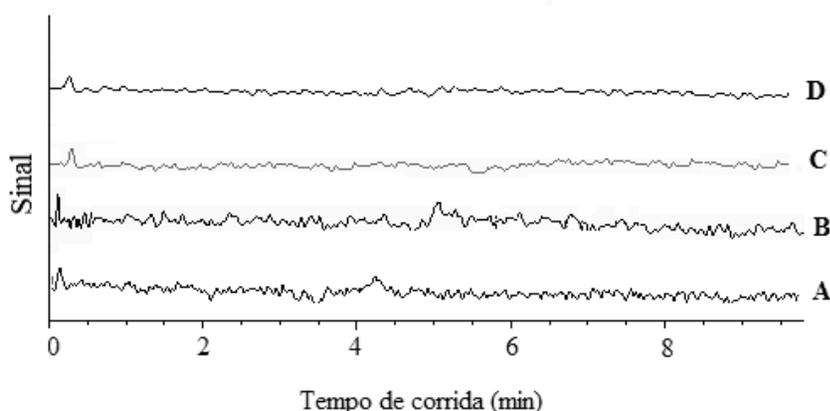


Figura 90. Linhas de bases obtidas com diferentes razões vazão de fase móvel/ vazão de solução rica em micelas de SDS de 0,8/0,2 (A), 0,8/0,5 (B), 0,5/0,5 (C) e 0,5/1,0 (D). Fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN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

Após a mistura na mola de reação (utilizando a relação entre as vazões de  $0,5/1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) tanto a concentração de SDS quanto a porcentagem de ACN foram reduzidas, devido à diluição. A composição estimada da solução resultante foi solução tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $66,7 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, 0,5 % de  $(\text{Et})_3\text{N}$ , 2% de propano-2-ol e 6,7% de ACN, em volume. Como a concentração de SDS ficou acima da CMC e a porcentagem de ACN abaixo de 20% pode se inferir que o meio é rico em micelas de SDS, nas condições estabelecidas. Um estudo adicional de ajuste da porcentagem de ACN na fase móvel, de 3 a 20% (v/v), foi realizado e se observou que quanto menor a quantidade do solvente orgânico, maior o tempo de retenção da GAL. O perfil cromatográfico, o ruído da linha de base e a intensidade fluorescência não sofreram alteração significativa em função da quantidade de ACN. Desta forma, a proporção de 20% de ACN foi mantida.

Na Figura 91 é apresentado o cromatograma obtido utilizando as condições escolhidas para a cromatografar a GAL e para produzir a fase final para medição de fluorescência após a mola de reação.

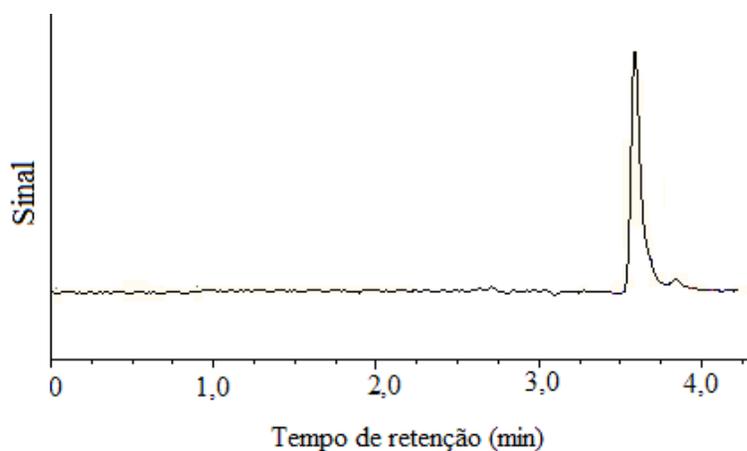


Figura 91. Cromatograma obtido pela introdução de uma solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) usando fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, com solução rica em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

Na Tabela 44 são apresentadas as condições escolhidas para a determinação da GAL por HPLC de fase reversa e detecção fluorimétrica com adição de solução micelar na mola de reação após-coluna cromatográfica.

Tabela 44. Condições experimentais para a determinação de GAL por HPLC de fase reversa usando abordagem com mistura de solução na mola de reação após a coluna cromatográfica.

Parâmetros	Condições otimizadas
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse C18 (4,6x150 mm, diâmetro de partícula 5µm)
Composição da fase móvel aquosa	Tampão acetato de sódio:ácido acético (10 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 5,0), 0,5 % de (Et) <sub>3</sub> N e 2% de propan-2-ol (v/v)
Proporção de fase móvel/ACN (v/v)	80:20
Composição da solução adicionada após a coluna	Tampão acetato de sódio:ácido acético (10 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 5,0) contendo 100 mmol L <sup>-1</sup> de SDS, 0,5 % de (Et) <sub>3</sub> N e 2% de propan-2-ol (v/v)
Vazão da bomba principal (mL min <sup>-1</sup> )	0,5
Vazão da bomba secundária (mL min <sup>-1</sup> )	1,0
Temperatura da coluna (°C)	25
Tempo de retenção, em min (λ <sub>exc/em</sub> , em nm)	3,6 (285/330)
Tipo de eluição	Isocrática
Deteção	Fluorimétrica

A superposição dos cromatogramas resultantes da introdução de GAL (11,5 µg mL<sup>-1</sup>) utilizando a abordagem com mistura de soluções na mola de reação é mostrada na Figura 92 de modo a indicar a amplificação de fluorescência do analito em função da presença ou não de micelas de SDS na solução adicionada após a coluna cromatográfica. Observa-se que houve um aumento significativo (de 3 vezes, o que equivale ao valor de MEF) na área do pico cromatográfico da GAL quando a deteção fluorescente ocorreu em meio rico em micelas de SDS. Em contrapartida, a linha de base obtida com a adição de solução micelar apresentou maior ruído comparada a linha de base obtida com a adição de solução sem o surfactante.

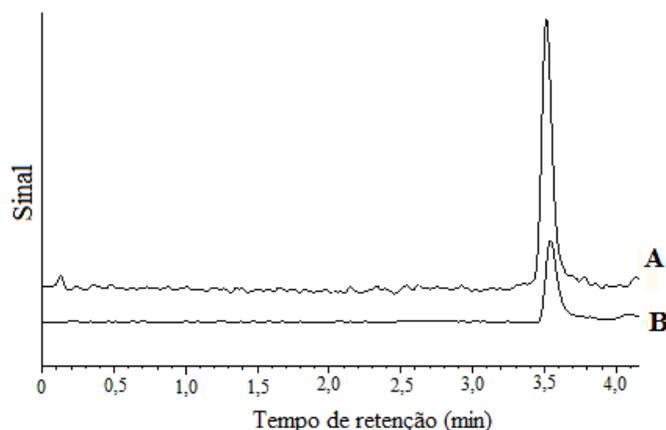


Figura 92. Cromatograma obtido pela introdução de uma solução de GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) usando fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, de (A) solução rica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

### 5.3.3

#### Determinação da GAL usando HPLC com fase reversa e detecção fluorimétrica com abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica

As condições experimentais estabelecidas (Tabela 44) foram utilizadas para a determinação da GAL usando HPLC com as abordagens de mistura de solução rica em micelas de SDS após a coluna cromatográfica e de mistura de solução tampão (pH 5,0) sem a presença de micelas. As curvas analíticas, para ambas as abordagens, foram construídas utilizando a mesma faixa de concentração, 2,9 a 290 ng, a partir de diferentes volumes de injeção (1 a  $100 \mu\text{L}$ ), totalizando 10 níveis de massa introduzida (M1 a M10). Os volumes de  $1 \mu\text{L}$  (M1),  $40 \mu\text{L}$  (M5) e  $100 \mu\text{L}$  (M10) foram introduzidos em cinco réplicas a fim de determinar a repetibilidade nas duas situações de adição de solução na mola de reação. Todas as outras soluções foram medidas em três réplicas autênticas. As soluções utilizadas na construção da curva analítica e estudo da repetibilidade foram preparadas no dia da análise, e armazenadas

ao abrigo da luz para serem utilizadas 24 h depois para a obtenção da precisão intermediária.

Na Figura 93 são mostradas as curvas analíticas onde o aumento da sensibilidade da resposta analítica da GAL na abordagem com a adição de solução rica em micelas de SDS é evidente.

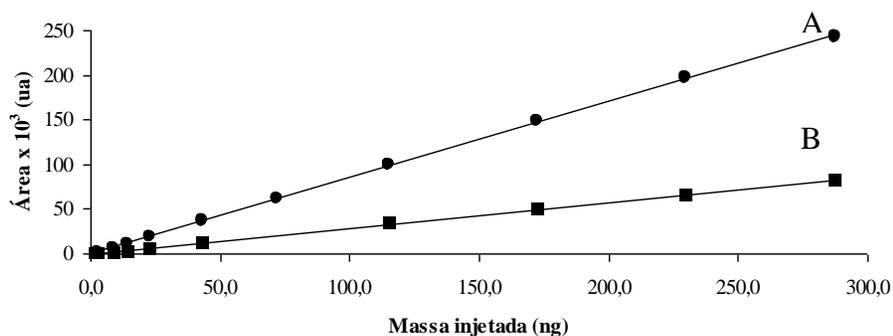


Figura 93. Curva analítica construída para GAL feitas com adição na mola de reação após a coluna cromatográfica de (A) de solução rica em micelas de SDS e (B) solução sem surfactante.

Na Figura 94 são mostrados os gráficos de resíduos padronizados (razão do valor do resíduo pelo erro puro) em função a massa de analito introduzido no sistema cromatográfico relativo às curvas analíticas da Figura 35. Uma distribuição aleatória e, portanto, não tendenciosa em termos dos desvios, indicou homocedasticidade das variâncias e a linearidade da resposta analítica em ambos os casos. A significância da diferença entre os valores das áreas calculadas e as experimentais foi determinada utilizando ANOVA (teste-F).

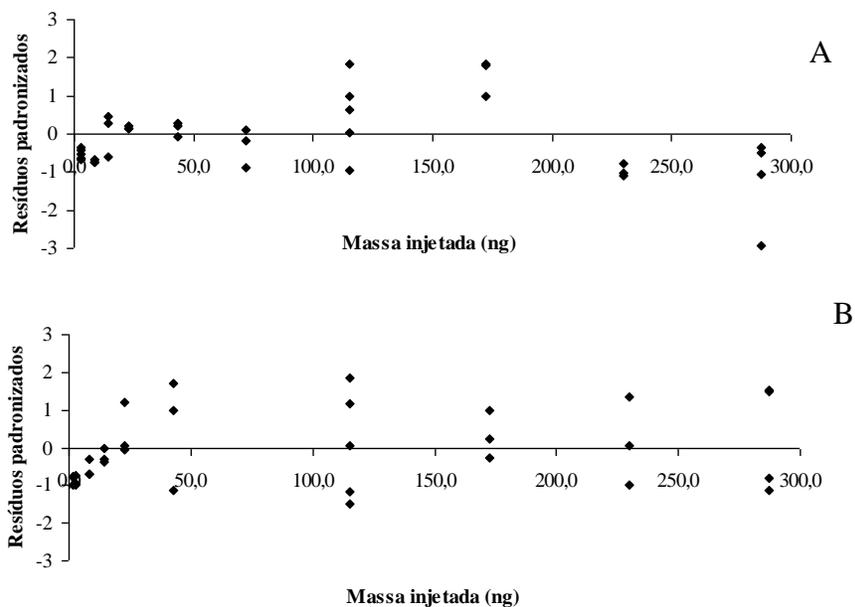


Figura 94. Gráfico de resíduos das curvas analíticas da GAL feitas com adição na mola de reação após a coluna cromatográfica de (A) de solução rica em micelas de SDS e (B) solução sem surfactante.

Os valores de LOD e LOQ e os respectivos, ALOD e ALOQ (considerando o volume de injeção igual a 40  $\mu$ L) foram calculados nas situações onde se misturou com a fase móvel a solução rica em micelas de SDS e a solução sem SDS, sendo em torno de 1,6 vezes maiores no caso da adição da solução rica em micelas de SDS. O MEF for avaliado em termos das razões das sensibilidades das curvas analíticas e seu valor seria aproximadamente de 3,1.

O cálculo de repetibilidade e da precisão intermediária foram feitos utilizando a ANOVA e os resultados indicam que há uma homogeneidade nas variâncias dentro dos grupos (repetibilidade) e entre os grupos (precisão intermediária) para GAL determinada em ambas situações. Todos os valores de repetibilidade e de precisão intermediária encontram-se entre 0,1 e 2%.

Na Tabela 45 são apresentados os parâmetros analíticos de mérito, como LOD, LOQ, faixa de trabalho, equação da curva analítica, repetibilidade e precisão intermediária, da GAL em ambas as situações de mistura de soluções na mola de reação.

Tabela 45. Parâmetros de mérito para as abordagens por HPLC com adição de solução após coluna cromatográfica.

Parâmetros analíticos	Com adição	
	de solução rica em micelas de SDS	Com adição de solução sem surfactante
LOD (ng g <sup>-1</sup> )	40,8	25,0
ALOD (ng)	1,6	1,0
LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	60,0	40,8
ALOQ (ng)	2,4	1,6
Faixa de trabalho (ng)	2,9 – 287,0	
Curva analítica (sensibilidade em ng <sup>-1</sup> )	y = (851 ± 1) x + (58,53 ± 137)    y = (277,2 ± 0,8) x + (338 ± 117)	
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,99	0,99
Repetibilidade, em ng (CV, %)	M1	0,06 (2)
	M5	0,6 (0,5)
	M10	0,7 (0,3)
Precisão intermediária, em ng, (CV, %)	M1	0,02 (1)
	M5	0,2 (0,2)
	M10	0,5 (0,2)

M1: GAL (2,9 ng); M5: GAL (115 ng); M10: GAL (287 ng)

Os ensaios de recuperação foram realizados com água coletada no riacho localizado na PUC-Rio. A amostra foi fortificada com uma solução padrão da GAL e diluída em fase móvel aquosa, na proporção igual a 1 parte de amostra para 1,5 partes de solução de composição idêntica à da fase móvel do método. A concentração final de GAL na amostra de água do riacho foi igual a 2,87 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram introduzidas, variando o volume de injeção, no sistema cromatográfico nas condições experimentais indicadas na Tabela 44 para a abordagem com adição de solução rica em micelas de SDS na mola de reação após a coluna cromatográfica. Três réplicas autênticas da amostra de água de matriz de riacho fortificadas foram preparadas.

Na Figura 95 são mostrados os cromatogramas da amostra fortificada com GAL e o respectivo ensaio de branco de amostra (água de riacho não fortificado com o analito).

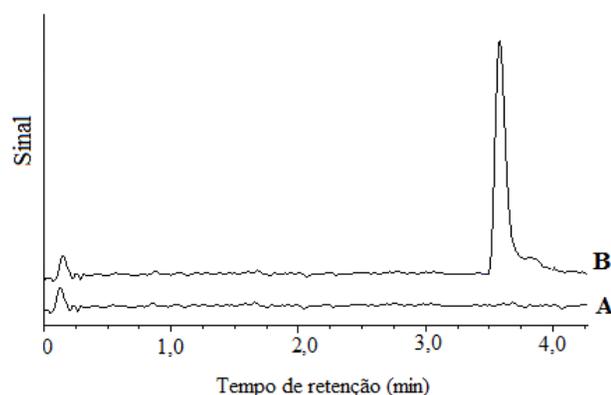


Figura 95. Cromatograma obtido pela introdução de amostra de riacho por HPLC usando a abordagem de mistura de solução rica em micelas de SDS na mola de reação após a coluna cromatográfica: (A) amostra fortificada com GAL ( $11,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e (B) ensaio com branco de amostra. Fase móvel de tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) propano-2-ol (2%)/ACN (80/20% v/v) com mistura, na mola de reação, de solução rica em micelas preparada em tampão acetato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 5,0) contendo SDS ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $(\text{Et})_3\text{N}$  (0,5%) e propano-2-ol (2%). A razão entre a vazão da fase móvel e a vazão da solução rica em micelas foi igual  $0,5/1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Temperatura da coluna de  $25^\circ\text{C}$ ; volume de amostra de  $40 \mu\text{L}$ ; detecção em  $285/330 \text{ nm}$ .

A recuperação foi avaliada em três níveis distintos de massa introduzida de analito correspondentes aos volumes de injeção de 1, 50 e  $90 \mu\text{L}$ . As recuperações, calculadas são apresentadas na Tabela 46. Os valores de recuperação obtidos para GAL (faixa entre 95,0 e 99,1%) em amostra de água de riacho ficaram dentro da faixa de recuperação aceitável de 80 a 120% (MAPA, 2011). O maior desvio resultante da medida da recuperação foi igual a 3,0%.

Tabela 46. Valores de recuperação e seus respectivos desvios padrão para a GAL em água de riacho usando o método de HPLC com adição de solução rica em micelas de SDS na mola de reação após a coluna cromatográfica.

Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	Massa de analito introduzida (ng)	Recuperação (%)
1	2,9	$95,0 \pm 3,0$
50	143,5	$99,7 \pm 1,2$
90	258,3	$99,1 \pm 0,3$