

6

Resultados e discussão: Avaliação da viabilidade do uso do procedimento de derivação fotoquímica de glicocorticóides em cromatografia líquida, para fluidos biológicos.

6.1.

Interferência da hidrocortisona

A aplicação da metodologia desenvolvida nesse trabalho para a determinação direta de prednisolona e triancinolona acetinado em fluidos biológicos, em especial urina, é impossibilitada pela presença de glicocorticóides naturais, em especial a hidrocortisona. Isso se deve ao sinal fluorescente induzido para essa substância ser na mesma região espectral do sinal fluorescente obtido para a prednisolona e para a triancinolona acetinado, porém com menor intensidade. Na Tabela 14, é mostrada a diferença de sinal fluorescente (240/350 nm) obtido para a hidrocortisona em relação ao da prednisolona.

Tabela 14: Fluorescência (240/350 nm) da hidrocortisona e prednisolona após procedimento de derivação fotoquímica.

Substância	$I_F - I_B$ (ua)
Prednisolona	135
Hidrocortisona	105

Assim, para se efetivar a determinação dos analitos de interesse em urina, é indispensável uma prévia separação dos analitos por técnica cromatográfica em meio líquido. O ponto crucial seria descobrir se o procedimento de separação dos componentes deveria ser antes (com coleta das frações dos glicocorticóides e detecção fluorimétrica fora de linha) ou depois do processo de derivação fotoquímica (com

separação dos fotoderivados fluorescentes na coluna cromatográfica e determinação em linha). E o ponto crítico que definiria essa estratégia seria descobrir se os fotoprodutos gerados para a prednisolona, triancinolona acetinado e hidrocortisona podem ser separados por cromatografia.

6.2.

Otimização dos parâmetros experimentais da detecção fluorimétrica no HPLC

A primeira etapa desse estudo foi a de otimizar as condições instrumentais da detecção fluorimétrica dos fotoprodutos em linha no sistema HPLC. Nessa etapa, as medições dos sinais de fluorescência dos fotoprodutos foram feitas com o detector de fluorescência HP-1046A acoplado ao cromatógrafo líquido HP-1050. Para isto um volume de 50 μL da amostra foi injetado no sistema cromatográfico, sem a coluna cromatográfica estar instalada. Desta forma toda a amostra injetada era rapidamente arrastada pela água (utilizada como fase móvel) e levada ao detector de fluorescência, onde o sinal pôde ser medido em termos de área de pico. Para assegurar a qualidade da medida de fluorescência pelo detector, foram calculados o erro relativo de 10 injeções de uma mesma amostra, e o desvio padrão relativo para esta medida foi de 4,5 %.

Os principais parâmetros a serem otimizados foram: a frequência de pulso da lâmpada, o tempo de resposta e a amplificação do detector. A frequência de pulso define quantas vezes a amostra vai ser interrogada durante a passagem da amostra na janela de detecção. O detector oferece três diferentes valores de frequência (55, 110 e 220 Hz), quanto maior este valor mais luz é incidida sobre a amostra, mais pontos de sinais são gerados e conseqüentemente melhor o sinal de fundo, desta forma o uso de valores maiores permite a obtenção de um sinal de menor ruído. Todavia, quando maior a frequência menor também é a intensidade do pulso e maior o desgaste da lâmpada, assim optou-se por utilizar a menor frequência, já que a amplitude do sinal não sofreu alteração significativa quando testada as três frequências.

A amplificação do sinal é controlada pela voltagem aplicada ao detector e por sua vez no número de elétrons gerados no tubo fotomultiplicador (detector) por fóton incidente. Um valor de compromisso entre as magnitudes do sinal e do ruído gerado

deve ser observado. Dos três fatores de amplificação avaliados (14, 16 e 18) o maior foi o escolhido por gerar o maior sinal fluorescente sem que o sinal do ruído fosse significativo.

A função tempo de resposta controla o intervalo de tempo entre as leituras do sinal fluorescente. Aumentando o intervalo de tempo diminui-se a contribuição de interferentes no ruído da linha de base. Assim o maior tempo de resposta entre os avaliados (0,5; 1,0 e 2,0 s) foi o escolhido por gerar um pico mais bem definido, já que se trabalhou com sinais baixos. A Tabela 15 a seguir mostra um resumo dos parâmetros escolhidos para o detector de fluorescência do HPLC.

Tabela 15: Parâmetros otimizados para detecção de fluorescência no HPLC

Parâmetro	Valor
Frequência da lâmpada	55 Hz
Amplificação do sinal	18
Tempo de resposta	2,0 s

6.3.

Cromatografia em condições extremamente ácidas e neutralização da amostra

Para se utilizar a separação cromatográfica dos fotoprodutos, existe a necessidade de se avaliar a compatibilidade do meio em que se encontra a amostra com as colunas cromatográficas disponíveis. A alta acidez da solução de amostra submetida ao procedimento de derivação fotoquímica (H_2SO_4 1,5 mol L^{-1}) se torna um problema, uma vez que o meio extremamente ácido não é recomendado para a grande maioria das colunas cromatográficas existentes no mercado. Normalmente, a faixa de trabalho considerada segura para não danificar a fase estacionária é de pH entre 3 e 8.

Nozarki (2001), baseado no procedimento de Mattingly (1962), desenvolveu uma metodologia utilizando HPLC com detecção fluorimétrica (485/520 nm), para os produtos gerados por meio da derivação do cortisol e da corticosterona em meio

fortemente ácido. Essas soluções ácidas foram injetadas diretamente no HPLC e separados por coluna cromatográfica ODS-80 Tm, 5 μm da TSK, utilizando acetonitrila/tetrahidrofurano/tampão hidrogenofalato de potássio (40:6:54 v/v/v). No entanto, optou-se por não se utilizar essas condições por não serem apropriadas para trabalhos de rotina e devido aos riscos de danificar não somente as colunas, mas também as partes mecânicas do HPLC do Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro.

Desta forma, tentou-se adaptar uma etapa experimental com o objetivo de aumentar o pH das soluções para um valor de pelo menos 3. Nessa etapa optou-se pela adição de soluções de caráter mais básico que o do meio da amostra, mesmo sabendo que isso acarretaria em uma diluição dos analitos. Assim, testou-se a adição de pequenos volumes de tampão de fosfato de potássio monobásico (pH=6) ou de solução de hidróxido de sódio 32 % m/m à solução da amostra derivada antes de ser injetada no HPLC. No entanto, esse procedimento se mostrou pouco eficiente, pois além da dificuldade de se ajustar o pH com a adição de pequenos volumes, ainda ocorreu a formação de precipitado na forma de cristais que provavelmente são provenientes da formação de soluções saturadas de sais de sódio ou potássio pela reação com sulfato proveniente do meio sulfuroso (solubilidades dos sulfatos de sódio e de potássio, a 20 $^{\circ}\text{C}$, são respectivamente 0,5 e 0,12 g mL^{-1} de água). Essas soluções, mesmo passando por procedimentos de filtração, causaram entupimento no sistema de cromatografia líquida. O uso de hidróxido de amônia pareceu ser mais eficiente (solubilidade do sulfato de amônia é 0,76 g mL^{-1} de água) quando usada a partir de soluções aquosas 15 % m/m, na proporção de 2 partes da amostra para 1 parte da base. Nesse caso, conseguiu-se um pH final mais reprodutivo (pH em torno de 7). A compatibilidade entre a solução e a fase móvel também foi testada. Devido à precipitação do sal (sulfato de amônia) em meios orgânicos, a percentagem de água na fase móvel não pôde ser menor que 50 %. A partir de testes de compatibilidade, escolheu-se a acetonitrila/água (50/50, v/v) como fase móvel a ser testada.

Com este procedimento e condições experimentais definidas, testes para obtenção dos parâmetros cromatográficos foram realizados.

6.4.

Testes de retenção

Testes de retenção dos produtos obtidos pela derivação fotoquímica dos glicocorticóides foram feitos com amostras neutralizadas, utilizando o procedimento descrito na seção anterior, em diferentes colunas cromatográficas.

As soluções de prednisolona e triancinolona neutralizadas foram filtradas e injetadas no HPLC equipado com colunas de fase de C₁₈ ou de fase ciano. Foram testadas as colunas SymmetryShield RP18 3,5 μm (4,6 x 150mm) da Waters a Spherisorb ODS 2 – C₁₈ 5 μm (4 x 250mm) da HP e coluna de fase ciano a Lichrospher 100 CN 5 μm (4 x 125 mm) da Merck. Em nenhum dos casos houve retenção dos analitos, mesmo com variações na composição da fase móvel.

Com base no trabalho de Mason *et al.*(1992), fez-se a extração do derivado do analito formado do meio reacional com acetato de etila, e depois do solvente evaporado, o resíduo foi ressuspensionado com a fase móvel e então injetado na coluna Spheri-5 C₁₈. Foi testado a extração direta dos fotoprodutos (da hidrocortisona, prednisolona e triancinolona acetato) da solução com acetato de etila (2 extrações seguidas) com a subsequente evaporação do solvente. O resíduo foi ressuspensionado diretamente com acetonitrila/água (40/60, v/v). A amostra foi injetada no HPLC com a coluna SymmetryShield RP18, onde se obteve um pico fluorescente (Figura 27) no tempo de retenção de 7,7 min. Porém o mesmo pico foi observado para os três fotoprodutos. Isso indica que esses fotoprodutos são provavelmente iguais ou muito semelhantes, pois se comportaram similarmente frente a coluna C₁₈. Mais estudos seria necessários para se achar uma coluna e condições cromatográficas propícias, infelizmente, por falta de tempo, os estudos não foram adiante.

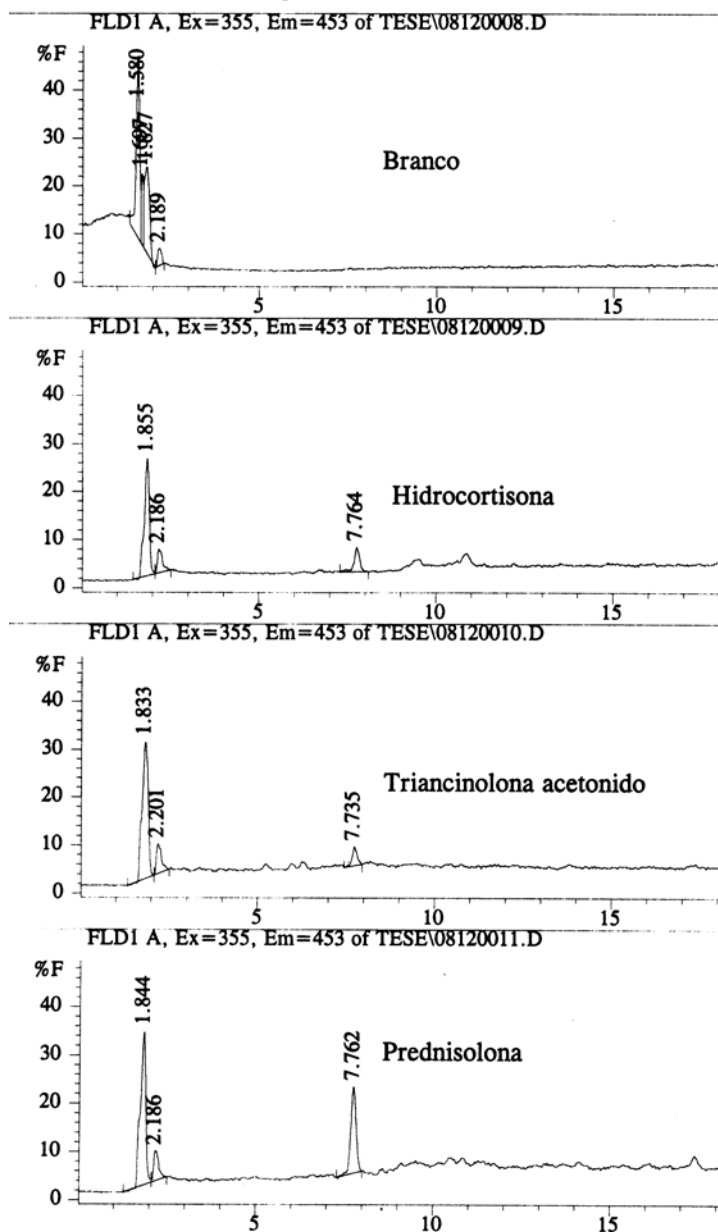


Figura 27: Cromatogramas adquiridos no HPLC HP-1050 com detector de fluorescência HP-1046A. Utilizando coluna SymmetryShield RP18 3,5 μm (4,6 x 150mm) da Waters, com fase móvel acetonitrila/água (40/60, v/v), vazão de 0,8 mL min^{-1} .

6.5.

Sugestões para utilização da cromatografia líquida com o procedimento de derivação fotoquímica

Uma alternativa simples para acoplar a cromatografia líquida com a detecção fluorimétrica seria por meio da adaptação do método cromatográfico padrão para glicocorticóides. Esse método, utilizado rotineiramente no laboratório antidoping, utiliza a separação dos glicocorticóides diretamente na urina em coluna C_{18} , que por sua vez são detectados por absorção na região UV. Conhecidos os tempos de retenção, as frações respectivas da prednisolona e triancinolona acetonido podem ser coletadas e então tratadas de acordo com o procedimento estabelecido para a derivação fotoquímica, visando a posterior detecção no espectrofluorímetro. Mesmo tornando o procedimento experimental mais complexo, o aumento de sensibilidade pode vir a ser vantajoso, principalmente por evitar a etapa longa de preparação da amostra usada no procedimento de determinação dos glicocorticóides, em HPLC-UV com colunas C_{18} (método utilizado pelo laboratório antidoping do Jockey Club Brasileiro). Esse procedimento consiste na extração líquido-líquido de 60 mL de urina e posterior extração em coluna de imunoafinidade (que são muito caras).