



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica

Laboratório de Pesquisas Farmacêuticas e Quimiometria (LabFarQui)



Quantificação de vitaminas hidrossolúveis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na presença de co-eluição e interferentes empregando resolução multivariada de curvas (MCR)

Aluna: Milena Ostorero Pereira Magalhães

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Cristina Breikreitz

1. Objetivos e Descrição da pesquisa

O objetivo central deste trabalho foi a quantificação de vitaminas hidrossolúveis empregando a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) com detecção por arranjo de fotodiodo (PDA do inglês, *Photo Diode Array*) na presença de co-eluição e interferentes em diferentes matrizes, como alimentos e suplementos vitamínicos, utilizando a Resolução Multivariada de Curvas-Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS do inglês, *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*). Para tal, incluiu-se objetivos específicos o desenvolvimento de um método de separação completa de todos os analitos, sendo eles as vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B6, B9 e B12) e a vitamina C, e outro método no qual houvesse co-eluição entre vitaminas ou com interferentes para que fosse possível aplicar o método quimiométrico MCR-ALS. As condições cromatográficas para a separação completa seriam estudadas com emprego de planejamento experimental.

Para o preparo das soluções estoque dos analitos, foi realizado um estudo de solubilidade de cada vitamina individualmente e da mistura delas, avaliando-se diferentes diluentes, como soluções tampão em diferentes pH's, incluindo solventes orgânicos como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN). Nesta etapa, chegou-se à uma condição de solubilização dos analitos, e foram avaliados os espectros de absorção na região do UV-Vis com o intuito de se utilizar seu perfil espectral na identificação do composto na mistura de todas as vitaminas.

Para se desenvolver um método de separação cromatográfica, inicialmente foi realizado um *screening* de colunas para UPLC para se avaliar o tempo de retenção dos compostos, a simetria dos picos, a resolução e a seletividade. O teste foi realizado com 5 colunas diferentes a fim de se escolher a que obtivesse os melhores parâmetros. As colunas avaliadas possuem dimensões de 2,1 x 50 mm e partícula de tamanho sub-2 μm , sendo elas: BEH C18, BEH C8, *Cortecs* C18+, BEH *Shield* RP18 e *Phenyl-Hexyl*. O equipamento utilizado para as corridas cromatográficas foi o cromatógrafo a líquido UPLC-PDA (Waters).

Após a escolha da coluna mais adequada, foram avaliados diferentes modificadores orgânicos (B) e diferentes pH's para o tampão da fase móvel aquosa (A), sendo eles pH 3 e 5, além de se investigar outras condições cromatográficas como a vazão de fase móvel, volume de injeção, tempo de gradiente e porcentagem inicial e final de modificador orgânico. Esta etapa também incluiu o estudo de um pareador iônico com a finalidade de se melhorar a retenção da vitamina B1.

A suspensão das atividades no campus da UNICAMP devido à pandemia de coronavírus prejudicou o andamento das atividades práticas do projeto, entretanto, neste período de reclusão social fez-se uma breve revisão sobre as ferramentas de DoE (do inglês, *Design of Experiments*) as quais seriam utilizadas para otimização do método cromatográfico e sobre o MCR-ALS, o qual seria empregado na separação matemática dos sinais co-eluídos, o que possibilitaria a quantificação efetiva das vitaminas.

2. Resultados

As vitaminas possuem diversas características físico-químicas distintas, a exemplo pode-se citar seu pKa, que gera equilíbrios ácido-base muito diferentes entre si. Dessa forma, foram avaliados diferentes diluentes e concentrações para se avaliar a solubilidade dos analitos, a qual é fortemente dependente do pH do meio. A Tabela 1 sumariza os principais resultados obtidos, sendo “S” para solúvel e “PS” para parcialmente solúvel.

Tabela 1. Solubilidade das vitaminas em concentração de 1 mg mL⁻¹ em diferentes diluentes. S= Solúvel; PS= Parcialmente solúvel. Onde não há informação o teste não foi realizado.

Vitamina	C	B1	B2	B3	B6	B9	B12
Etanol	S	PS	PS*	S	S	PS*	S
MeOH	S	S	PS*	S	S	PS*	S
Água	S	S	PS*	S	S	PS*	S
Água:MeOH (1:1)	-	-	S**	-	-	PS**	-
Tampão em pH 3	-	-	PS**	-	-	PS**	-
Tampão em pH 7	-	-	PS**	-	-	S**	-
Tampão (pH 7): MeOH (1:1)	-	-	S**	-	-	-	-
H ₃ PO ₄ 0,05 %	S	S	-	S	S	-	S
NH ₃ 0,5 %	-	-	S	-	-	S	-

*: Resultado correspondente à concentração de 0,2 mg mL⁻¹ e 1,0 mg mL⁻¹

** : Resultado referente à concentração de 0,2 mg mL⁻¹

Como pode-se observar pelos resultados da Tabela 1, a maioria das vitaminas apresentou-se solúvel na maior parte dos diluentes testados, entretanto as vitaminas B2 e B9 foram as que apresentaram maior dificuldade de solubilização. Estas, por sua vez, têm sua solubilidade aumentada em meio alcalino (pH~8), sendo assim, estas passaram a ter sua solução estoque preparada com uma solução de NH₃ 0,5 % e as demais vitaminas foram preparadas em meio ácido de H₃PO₄ 0,05 %. Como as vitaminas já estavam solúveis individualmente não houve problemas de solubilização destas na mistura de todas elas.

Após os testes de solubilidade, foram obtidos os espectros de absorção na região do UV-Vis para se avaliar os perfis espectrais das vitaminas e se encontrar um comprimento de onda de máxima absorção comum (223 nm) a fim de detectá-las na mistura. Os espectros de absorção foram obtidos em pH 3 e 5, os quais estão apresentados nas Figuras 1 A e B, respectivamente, onde fica evidente as diferenças no equilíbrio ácido-base dos compostos, já que alterando-se o pH os espectros têm seu perfil e sua intensidade alterados.

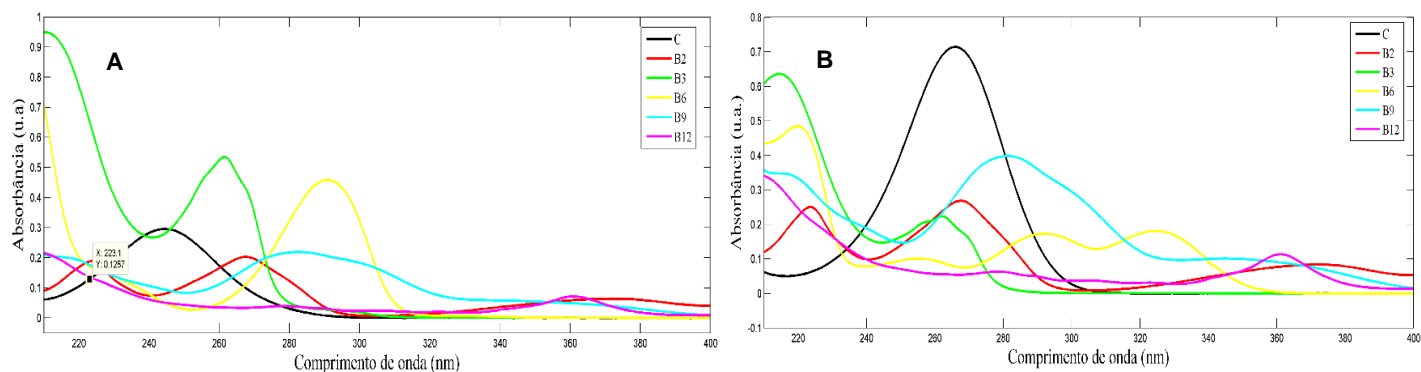


Figura 1. Espectro de absorção para todas as vitaminas, exceto a VB1, em pH 3 (A) e pH 5 (B).

Na próxima etapa, foram avaliadas diferentes colunas utilizando-se MeOH, ACN e fase aquosa com tampão fosfato de amônio em pH 3 e 5. Todas as condições foram avaliadas injetando-se a mistura das vitaminas e a coluna que apresentou melhor simetria dos picos, tempos de retenção, resolução e seletividade foi a BEH C18. Além disso, avaliou-se qual o melhor pH para a fase móvel (A), a fim de se obter melhor resolução cromatográfica. Nesse sentido, melhores resultados foram obtidos em pH 5 utilizando-se MeOH. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 2.

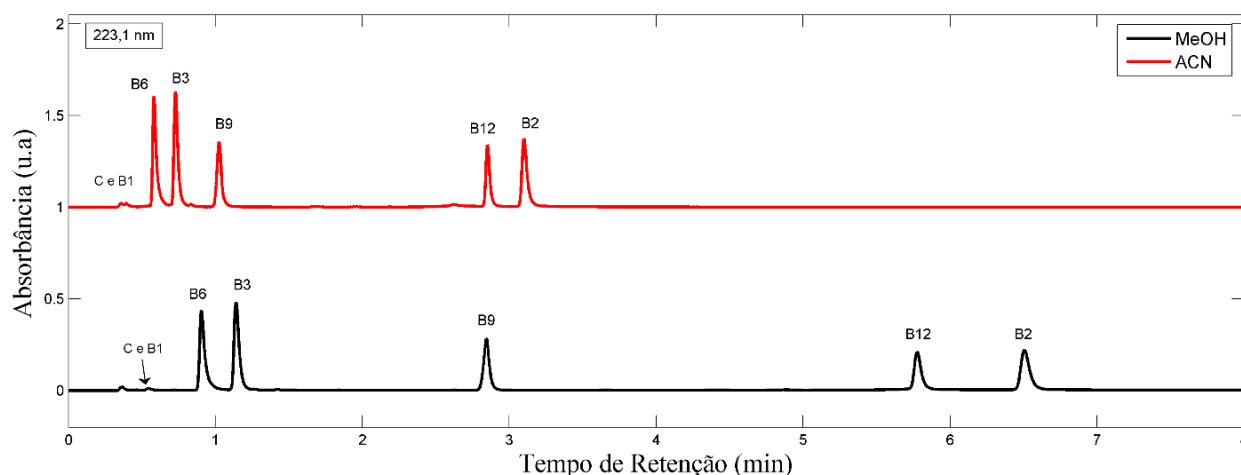


Figura 2. Cromatograma da mistura das vitaminas na coluna BEH C18 com fase móvel em pH 5 e ACN (em vermelho) e MeOH (em preto) como modificador orgânico. Condições cromatográficas: vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção $1,0 \text{ }\mu\text{L}$, fase aquosa (A) tampão fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} (pH 5), fase orgânica (B) MeOH. Eluição em modo gradiente: 5% até 35% de B em 10 min.

Devido à baixa retenção da vitamina B1, catiônica, avaliou-se o uso de um pareador iônico (heptanossulfonato de sódio) na fase móvel (A), o qual apresenta grupos aniônicos que poderiam, através de mecanismos de adsorção e/ou partição, aumentar a retenção desta vitamina, já que formando uma molécula neutra após a interação eletrostática de ambos sua interação com a coluna, que é apolar, seria aumentada. Resultados promissores foram obtidos com o uso do pareador iônico, então avaliou-se a separação da mistura das

vitaminas utilizando-se este na fase móvel (A), sendo que o melhor resultado também foi atingido utilizando-se MeOH. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 3.

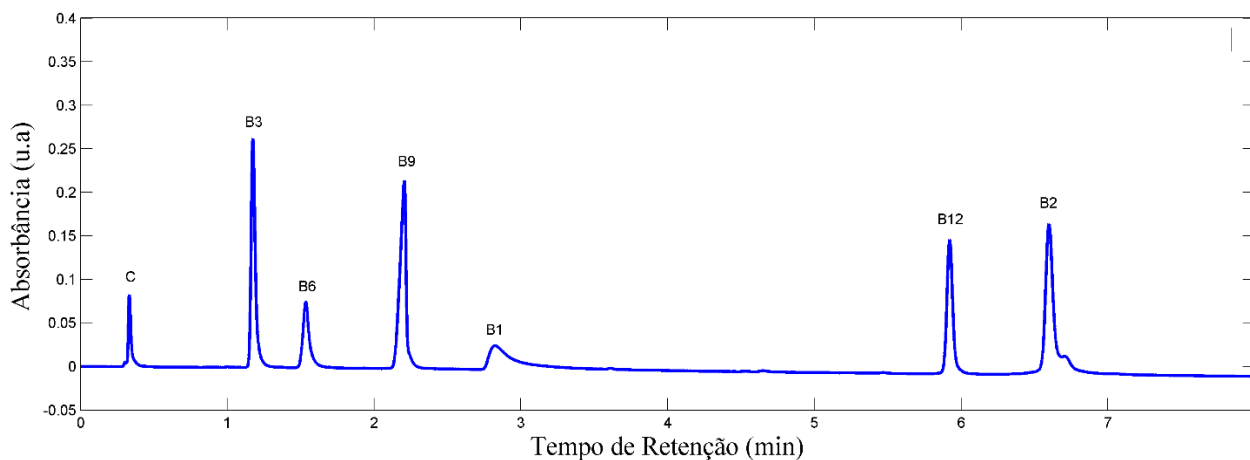


Figura 3. Cromatograma obtido para a mistura das vitaminas com o uso do pareador iônico na fase (A) e coluna BEH C18. Condições cromatográficas: vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção $1,0 \text{ }\mu\text{L}$, fase aquosa (A) tampão fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} (pH 5) com heptanossulfonato de sódio $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, fase orgânica (B) MeOH. Eluição em modo gradiente: 5% até 35% de B em 10 min. Detecção em 234 nm .

Com o comprometimento da finalização da pesquisa, pretende-se continuar com os objetivos iniciais através da bolsa já aprovada para quota 2020/2021, com foco na utilização das ferramentas de Planejamento de Experimentos (DoE, *Design of Experiments*) para otimização do método desenvolvido nesta etapa. Posteriormente, será desenvolvido um método com tempo de análise reduzido e co-eluição entre os analitos, o qual será utilizado para avaliação do desempenho do algoritmo MCR-ALS para quantificação dos analitos netas condições. Por fim, os resultados serão comparados criticamente.