



PUC
RIO

CNPQ / PIBIC 05/2006

Departamento de Química

Aluna: Flávia da Silva Figueiredo

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio

Título do projeto: Desenvolvimento de métodos analíticos eletroquímicos e espectrofluorimétricos para compostos de Interesse farmacológico: Método fosforimétrico para a determinação de dois derivados de harmine e de harmine

Índice

1. Introdução	3
1.1.b-Carbolinas	3
1.2.Fosforescência	5
1.3.Parâmetros que afetam o sinal fosforescente	6
2. Objetivos	8
3. Materiais e Métodos	8
3.1.Materiais e reagentes	8
3.2.Instrumentação	9
3.2.1. Espectrômetro de luminescência	9
3.2.2. Reator fotoquímico	9
3.2.3. Sistema de lavagem dos papéis	10
3.2.4. Sistema de secagem a vácuo	11
3.3.Procedimentos	11
3.3.1. Procedimento de preparação de substrato de celulose de baixo sinal de fundo	11
3.3.2. Procedimento geral para medição do sinal fosforescente	11
4. Resultados e Discussões	12
4.1.Otimização dos parâmetros instrumentais	12
4.1.1. Fosforescência em função do pH	12
4.1.2. Fosforescência em função do efeito do átomo pesado e do pH	13
4.1.3. Efeito do SDS como modificador de superfície do substrato de celulose	19
4.1.4. Efeito do SDS como modificador de superfície do substrato de celulose associado à variação de pH e na presença de diferentes íons de átomo pesado	20
4.1.5. Efeito da fosforescência após tratamento fotoquímico	23
4.1.6. Parâmetros analíticos de mérito (PAM)	23
4.2.Determinação Seletiva	27
4.2.1. Determinação de harmine na presença de harmane	27
4.2.2. Determinação de harmane na presença de harmine	29
4.2.3. Determinação de harmine na presença de harmane em urina fortificada	30
4.3.Determinação de harmane em chás (amostras fortificadas)	31
4.3.1. Determinação de harmane em chás	31
4.3.2. Parâmetros analíticos de mérito (PAM)	32
5. Conclusões	33
6. Trabalhos Futuros	33
7. Referências	34

FOSFORIMETRIA NA TEMPERATURA AMBIENTE E EM SUBSTRATO SÓLIDO (FTASS) PARA A DETERMINAÇÃO DE DOIS DERIVADOS DA β -CARBOLINA (HARMANE E HARMINE)

1. Introdução

1.1. β -Carbolinas

O harmane (1-metil- β -carbolina) e o harmine (7-metóxi-1-metil- β -carbolina) pertencem à família das β -carbolinas. Suas estruturas químicas (Figura 1) estão relacionadas com as estruturas das aminas aromáticas heterocíclicas, as quais são identificadas como produtos da pirólise de aminoácidos e proteínas contidas em carne ou peixe cozidos, por exemplo. O harmane, especificamente, é um dos principais produtos obtidos da pirólise do D, L-triptofano.¹ Além disso, o harmane também é um dos produtos da oxidação de um outro β -carbolina, o 1-metil-tetrahydro- β -carbolina, o qual é formado no organismo após a ingestão de álcool, sendo maior a sua concentração durante o período de ressaca.² O harmane e o harmine também são constituintes normais do corpo e são produzidos *in vivo* pela ciclização de alquilaminas-indólicas com aldeídos, ocorrendo na maioria dos tecidos animais e humanos.³

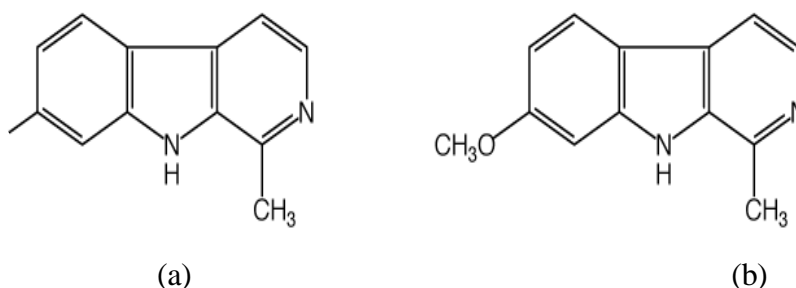


Figura 1: Estruturas do harmane (a) e do harmine (b)

Em países em desenvolvimento, uma boa parte da população ainda usa a medicina tradicional para satisfazer as suas necessidades de saúde, e as plantas medicinais ainda constituem um material básico para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novas drogas. O harmane e o harmine estão presentes em várias plantas medicinais, tais como a *Grewia bicolor*, a *Tribulus terrestris*, a *Passiflora incarnata* e principalmente a *Peganum harmala* L. (Figura 2), a qual contém cerca de 55,5 mg de harmine por grama de extrato seco da planta.^{4,5}



Figura 2: Planta medicinal *Peganum harmala* L., fonte de harmane e harmine

As sementes da *Peganum harmala* L., em pequenas doses (25 – 50 mg), agem como estimulantes terapêuticos cerebrais brandos, algumas vezes provocando sono durante um período de 1-2 horas. Em doses maiores (acima de 750 mg) os efeitos são alucinógenos, podendo até mesmo causar paralisia.⁶

Inicialmente conhecidos por suas potentes ações psicoativas e alucinógenas, estes compostos têm mostrado uma grande variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividades antimicrobiais, antivirais, anticonvulsivas, hipnóticas, vasorelaxantes, anti-HIV e antitumorais.⁷ A importância dessas substâncias no sistema biológico deve-se ao fato de possuírem funções antioxidantes⁸ e de terem forte efeito no sistema nervoso central, interagindo com sistemas neurotransmissores tais como os receptores serotonina e dopamina.

Devido à presença destes compostos em uma variedade de alimentos como o arroz, o milho e carnes e peixes fritos ou grelhados (mais de 184 ng g⁻¹), em bebidas como o vinho, a cerveja e o uísque (acima de 42 µg.mL⁻¹) e em cigarros (mais de 14,1 µg.g⁻¹ de tabaco), eles são agora considerados como contaminantes comuns da dieta diária das pessoas^{1,9,10}. Após exposição aos mesmos, eles podem ser encontrados e quantificados em urina (em níveis de 97,7 a 259 ng em um volume total de amostra coletada em 24 horas) e em sangue humanos. Acredita-se que a sua presença no sangue possa ser originada da condensação da triptamina e do acetaldeído.¹ Embora pouco se saiba sobre o mecanismo de transporte destas β-carbolinas ao longo da membrana celular, o seu nível de fototoxicidade tem uma relação direta com a permeabilidade da droga na membrana.¹¹

O harmane e o harmine também são responsáveis por uma doença que causa uma desordem neurológica complexa dos movimentos, provocando tremores involuntários que normalmente atingem as mãos, mas que também podem afetar a cabeça, a face, o maxilar, a língua, a voz, as pernas e os pés. Esta doença atinge mais de dez milhões de pessoas nos Estados Unidos e é considerada até mais comum que o mal de Parkinson, o qual além do tremor, também causa lentidão dos movimentos. Um estudo em pacientes com esta doença, mostrou que os níveis de harmane eram duas vezes maiores no sangue de pacientes humanos se comparados com o sangue de animais, sugerindo que pacientes cronicamente expostos a altos níveis de harmane em suas dietas, metabolizam este alcalóide de forma diferente ou simplesmente produzem maior quantidade deste.^{3,12}

O estudo de suas propriedades anticancerígenas mostrou que a presença de harmane na dieta de macacos provocou alterações celulares, principalmente no fígado e no rim¹. Um outro estudo, também em macacos, mostrou que o harmine teve um efeito moderado contra um tipo de câncer no pulmão.⁷

Conforme já foi mencionado, o harmine constitui um dos principais metabólitos do harmane. Cerca de 13% do harmane administrado oralmente por ratos, foi transformado em harmine (análise feita em sangue por HPLC). O aparecimento de harmine no sangue após a administração oral de harmane, sugere que este sofre prioritariamente uma biotransformação hepática ao invés de entrar diretamente na circulação sanguínea. O harmane, uma vez absorvido pelo corpo, sofre um primeiro passo do metabolismo pelo citocromo P-450 no fígado, produzindo o metabólito 7-hidroxil, o qual é metilado para gerar o harmine. Uma porção deste harmine entra na circulação sanguínea, enquanto que uma outra porção é catalisada pela enzima P-450 para hidroxilação ou eliminação na biliar. Uma vez que a metilação do 7-hidróxi-harmane aumenta a lipofilicidade, o harmine pode ser mais favoravelmente distribuído pelos tecidos do corpo¹³.

1.2. Fosforescência

O fenômeno luminescente é definido como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível de energia excitado para um outro nível de menor energia, o que é decorrente da interação entre a matéria com a radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta (UV). A luminescência estimulada pela absorção de radiação é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e em fosforescência.¹⁴

Quando uma molécula absorve um fóton, ela é promovida para um estado de maior energia (estado excitado). Nessa transição eletrônica, elétrons de valência são promovidos para outro orbital, com um aumento concomitante na energia da molécula.¹⁵ A natureza dos orbitais envolvidos em uma transição eletrônica é um fator importante na determinação das características luminescentes da molécula.

A fosforescência de moléculas orgânicas pode ser definida como a transição radiativa, originada do estado excitado tripleto de mais baixa energia, T_1 , para o estado fundamental singleto, S_0 . Esse processo é demorado (10^{-3} a 10 segundos), e pode ser observado sob condições específicas, devido ao acoplamento spin-órbita, interno ou externo, que mistura estados singleto puros e estados tripleto, para produzir estados com características mistas em multiplicidade de spin¹⁶. O processo foto-físico descrito acima é mostrado na Figura 3.

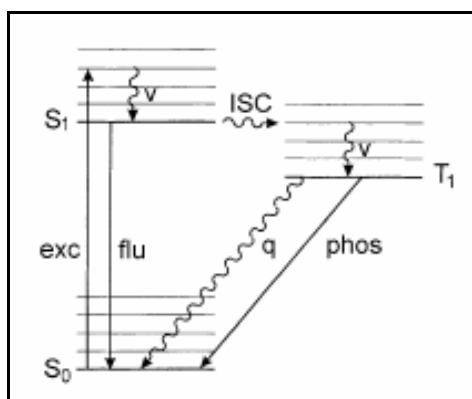


Figura 3: Representação esquemática do processo de fosforescência em temperatura ambiente. S_0 , estado singleto fundamental; S_1 , primeiro estado singleto excitado; T_1 , Primeiro estado excitado tripleto; exc, excitação; flu, fluorescência; v, relaxamento vibracional; ISC, cruzamento de sistemas; q, quenching bimolecular; phos, fosforescência

Com o objetivo de obter a fosforescência direta, a molécula é foto-excitada com comprimento de onda apropriado. Após a excitação, ocorrem rapidamente a desativação vibracional e conversão interna. Por esta razão, a fluorescência, fenômeno radiativo, é geralmente emitida do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado singleto, S_1 . Uma fração significativa de moléculas excitadas poderá sofrer cruzamento intersistemas (ISC) para T_1 , envolvendo o acoplamento vibracional de S_1 para T_1 . Embora as transições singleto-triplete constituam processos proibidos, existe probabilidade para que ocorra a conversão interna do estado excitado singleto para o tripleto, uma vez que a energia do mais baixo nível vibracional do estado tripleto é inferior à que corresponde ao estado singleto¹⁷.

A existência de moléculas no estado tripleto não é o único requisito para que ocorra o processo de fosforescência. Para que seja eficiente, o processo de desativação pela fosforescência deve ser capaz de competir com outros tipos de desativação disponíveis para o estado tripleto – desativação por processos não-radiativos e desativação (quenching) bimolecular do oxigênio molecular dissolvido e outros desativadores.

Conforme já foi mencionado, moléculas no estado T_1 possuem grande probabilidade de se desativar para S_0 por processos não-radiativos, por causa da diferença dos tempos de vida dos processos. Por isso, para aumentar a chance de uma molécula fosforescer, se faz necessário minimizar esses processos não-radiativos de desativação de T_1 .

A minimização das colisões moleculares entre o luminóforo e as moléculas do solvente e a restrição das vibrações moleculares foram primeiramente realizados pelo congelamento da amostra a 77 K. O uso de substratos sólidos ou de meio organizado em solução aquosa (micelas, por exemplo) vem permitindo a observação de **fosforescência na temperatura ambiente** (FTA).

A FTA surgiu como uma alternativa viável para o uso rotineiro das técnicas baseadas na fosforescência molecular, considerando que a técnica tradicional, desenvolvida usando matriz na temperatura de 77 K, é experimentalmente trabalhosa e sofrível com relação à repetitividade. O uso de substratos sólidos de baixo custo e de fácil preparação facilitou a observação de intensa fosforescência na temperatura ambiente. Graças à sua eficiência na imobilização de moléculas orgânicas, o substrato sólido tem demonstrado uma capacidade impressionante em permitir a observação de fosforescência de várias classes de analitos. Além disso, o substrato sólido é compatível com o uso de diferentes sais de átomos pesados, quando comparado com a outra maneira de se obter FTA: o meio micelar. O uso do meio micelar, na prática, tolera o uso de apenas dois (T e de Tl^+) dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente aplicados em fosforimetria. Esses fatos aumentam a versatilidade e a seletividade da aplicação analítica desse fenômeno com substrato sólido.^{18,19}

Entre os diversos materiais estudados para servir de substrato sólido em FTA, a celulose na forma de papel de filtro ou cromatográfico tem sido o mais conveniente. Uma de suas características peculiares é a interação entre o analito e os grupos hidroxila do papel por meio de ligações de hidrogênio¹⁸. Além disso, os poros da superfície do papel são sítios onde as moléculas do analito podem penetrar e interagir tridimensionalmente com o substrato após a secagem.¹⁴

Uma grande desvantagem do uso dos substratos de celulose é sua fosforescência natural (proveniente das ligninas e hemiceluloses do papel) que limita a sensibilidade da FTASS.²⁰ O principal procedimento para diminuir o sinal de fundo²¹ do papel consiste em uma etapa de lavagem com água fervente seguida de uma etapa de exposição à radiação ultravioleta. Esse procedimento, desenvolvido simultaneamente por Campiglia e de Lima²² e por McLeese e Dunlap²³, é capaz de reduzir o sinal de fundo em até 98%. Mais recentemente, a partir de um planejamento fatorial 2², Cardoso *et al*²⁴ adaptaram esses procedimentos para reduzir o tempo total do tratamento de 16 para apenas 4 h, com fatores de redução de sinal de fundo semelhantes aos obtidos com os procedimentos originais.

1.3. Parâmetros que afetam o sinal fosforescente

Vários fatores, que podem ser manipulados experimentalmente, afetam a fosforescência em substrato sólido e conseqüentemente o desempenho da técnica FTASS. Entre estes, podemos destacar a presença de espécies desativadoras, a natureza do solvente, o pH do meio onde o analito é dissolvido, a presença de íons de átomo pesado e a presença de modificadores de superfície tais como surfactantes. A seguir faz-se uma descrição do efeito de cada um desses fatores.

Influência do oxigênio e da umidade

A fosforescência de espécies luminescentes pode ser minimizada ou até mesmo eliminada por meio de interações com outras espécies químicas presentes. A este fenômeno dá-se o nome de quenching (“desativação do estado excitado”)¹⁸, podendo ser classificado em dois tipos: o estático e o dinâmico.

Tanto o problema da umidade quanto do oxigênio podem ser reduzidos através de secagem prévia do substrato e de purga de nitrogênio seco sobre a superfície do substrato de celulose antes e durante o procedimento de leitura da fosforescência.

Efeito do átomo pesado

O aumento do sinal fosforescente por átomos pesados pode ser induzido pela presença destes na forma de ligantes (efeito interno do átomo pesado)²⁵ ou por sais inorgânicos de átomos pesados adicionados à matriz do analito (efeito externo do átomo pesado)²⁶. No entanto é difícil prever qual íon de átomo pesado irá favorecer a fosforescência de um determinado analito. Por isso, é necessário um estudo sistemático para verificar o efeito dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente mais empregados (I⁻, Tl⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺).

Efeito do surfactante como modificador de superfície

O uso de surfactantes associados aos substratos sólidos tem sido proposto para a FTASS.²⁷ A adição de um agente surfactante aniônico, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido, pode produzir um grande aumento de sinal fosforescente, pois a longa cadeia alquil do ânion do surfactante pode proteger o analito contra fotodecomposição causada pela fonte de irradiação durante as medidas espectrais²⁸. Além disso, o surfactante na superfície do papel pode organizar as moléculas do analito, aumentando a quantidade de sítios ativos e a rigidez da molécula, e aproximando-as mais dos íons de metais pesados. Esse maior contato entre o analito e os íons de átomo pesado aumenta a probabilidade de acoplamento spin-orbital.²⁹ O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem nos poros da celulose, facilitando a interação destas moléculas com a superfície do papel. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessiva, o sinal tende a cair por causa, por exemplo, da dificuldade de interação entre o átomo pesado e a radiação incidente (efeito filtro).²⁸

Influência do sistema de solventes

O efeito da composição do sistema de solventes usado no sinal luminescente medido em solução é diferente do efeito na luminescência em substrato de celulose. Em solução, de acordo com Jablonski³⁰, substâncias aromáticas, tais como a maioria dos luminóforos, são mais polares quando estão no estado excitado, devido às mudanças na distribuição de elétrons π da molécula que acontecem na transição. As interações entre as moléculas do(s) solvente(s) com as moléculas do soluto têm caráter fortemente eletrostático¹⁸ e, como normalmente, são as diferenças entre as energias de estabilização do estado fundamental e do estado excitado que definem quais os processos (radiativos ou não-radiativos) são dominantes na desativação do estado excitado, conclui-se que o favorecimento dos processos de desativação radiativa é consequência da estabilização do soluto com o estado excitado mais polar, na presença de solventes mais polares. Embora a capacidade fotoluminescente seja principalmente em função

da estrutura molecular, o meio, particularmente o solvente de uma molécula potencialmente fosforescente, tem um grande efeito na presença de sinal fosforescente.¹⁸

Então, a escolha do solvente para depositar o analito no substrato sólido é de muita importância para a obtenção de um bom sinal fosforescente. A solubilidade do analito é logicamente um aspecto fundamental que também deve ser considerado.¹³

Influência do pH

Um outro fator muito importante para a obtenção de um bom sinal fosforescente é o controle do pH da solução do analito a ser depositada no papel. Von Wandruszka e Hurtubise³¹ primeiro notaram que a FTA do ácido p-aminobenzoico adsorvido em acetato de sódio diminuía muito em meios extremamente ácidos ou básicos. De Lima e M. Nicola³² em seus estudos com diversas substâncias orgânicas depositadas em papel de filtro, concluíram que cada composto em particular tem o seu melhor pH, cujo sinal fosforescente será máximo.

Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior f_p devido a protonação ou hidrólise ácida ou básica. Além disso, espécies com cargas têm maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de que espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel, produzindo uma ótima condição para FTA.³³

Enfim, o efeito do pH na intensidade fosforescente é largamente dependente da molécula analisada, sendo a escolha do pH muito importante para melhorar a sensibilidade da FTASS.³⁴

2. Objetivos

Os objetivos foram primeiramente o otimizar as condições experimentais e instrumentais para a determinação espectrofotométrica sensível de dois derivados da β -carbolina (harmane e harmine) validando parcialmente essas metodologias, e, em segundo lugar, avaliar a possibilidade da determinação seletiva de harmane e harmine em amostras contendo os dois derivados da β -carbolina utilizando apenas um simples ajuste das condições experimentais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais e reagentes

Os dois derivados da β -carbolina, harmane 98% e harmine 98%, foram adquiridos da Acros Organics (EUA). Os sais inorgânicos utilizados no preparo das soluções de átomos pesados foram de várias procedências. Nitrato de tálio (I) e acetato de cádmio dihidratado foram da Acros Organics (EUA); nitrato de prata, nitrato de chumbo (II) e cloreto de mercúrio (II) da Vetec (Brasil); iodeto de potássio da Merck (Brasil).

O surfactante utilizado como modificador de superfície foi o dodecil sulfato de sódio 99% proveniente da Merck (Brasil). O sulfato de sódio obtido também na Merck (Brasil) foi utilizado somente nos testes feitos para verificar se os analitos emitiam sinal fosforescente diretamente em solução.

Os solventes usados foram metanol P.A. da Merck (Brasil) e água ultrapurificada obtida do Ultra Purificador de água Master System 1000 – GEHAKA. Quando era necessário tornar o meio ácido ou básico, utilizou-se ácido clorídrico P.A. e hidróxido de sódio P.A., ambos da Merck (Brasil).

O nitrogênio comercial (99,96 %) utilizado para purgar o interior do espectrômetro de luminescência foi adquirido na AGA (Brasil).

Uma micropipeta regulável de 1 a 10 μL da Wheaton Socorex (Suíça) foi utilizada para a aplicação das soluções de analitos, átomos pesados e surfactantes no substrato de celulose. Para o preparo de soluções foi utilizada micropipeta regulável de 100 a 1000 μL da Brand (Brasil).

Os substratos sólidos utilizados para indução de fosforescência foram o papel Whatman 42 da Whatman Ltd (Inglaterra) fornecido pela J. Prolab (Brasil), sendo ambos previamente tratados para a redução do sinal de fundo³⁵.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Espectrômetro de luminescência

Os espectros de excitação e emissão fosforescentes foram obtidos em um espectrômetro de luminescência comercial da Perkin Elmer modelo LS 55 (Perkin Elmer, EUA) (Figura 4).

O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com $8\mu\text{s}$ de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5 sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm. Monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão.

Entre os vários acessórios que o equipamento possui, para realizar as medições de fosforescência em substrato sólido, foi utilizado o aparato de medição em superfície sólida que é acoplado no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência.



Figura 4: Espectrômetro de luminescência comercial da Perkin-Elmer – modelo LS 55

3.2.2. Reator fotoquímico

Um reator fotoquímico, cuja foto é mostrada na Figura 5a, foi montado em uma carcaça de estufa com o uso de um conjunto de seis lâmpadas de vapor de mercúrio de 6W (lâmpadas de esterilização) cuja emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) é em torno de 300 nm. Para irradiar as soluções

de analito foram utilizados tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura). Os papéis Whatman 42 e Qualy foram irradiados já cortados em círculos de 18 mm de diâmetro (Figura 5b).

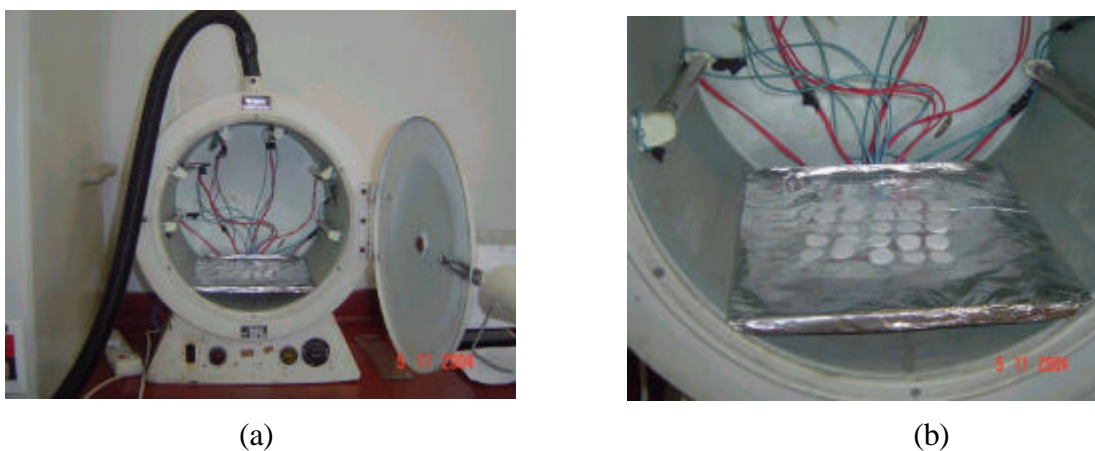


Figura 5: (a) Reator fotoquímico e (b) detalhe dos papéis sendo irradiados

3.2.3. Sistema de lavagem dos papéis

Para tratamento dos papéis utilizados como substrato sólido foi necessário submetê-los a um processo de lavagem em extratores Soxhlet (Figura 6a), seguido de secagem sob luz de lâmpada infra-vermelha de 150 W (Phillips, Brasil) mostrada na Figura 6b.

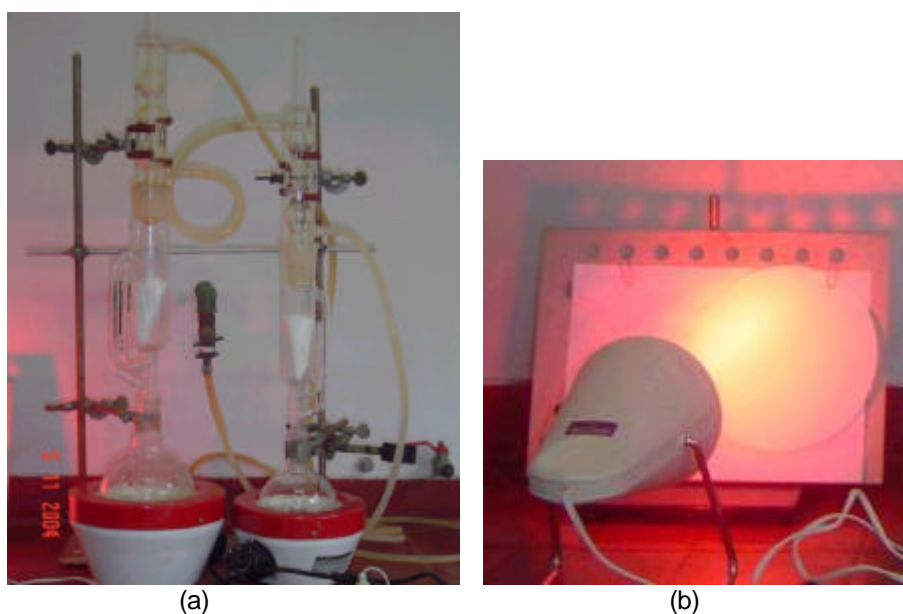


Figura 6: (a) Sistema para lavagem (soxhlet) e (b) secagem (lâmpada) do substrato de papel

Somente após estas etapas é que os papéis eram cortados em círculos de 18 mm de diâmetro e irradiados por duas horas, conforme mostra a Figura 6b.

3.2.4. Sistema de secagem a vácuo

Para a secagem dos substratos de celulose após deposição de amostras ou brancos, um dessecador a vácuo foi usado. O vácuo foi produzido por uma bomba da Fisatom (Brasil), modelo 820 de 300 W.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Procedimento de preparação de substrato de celulose de baixo sinal de fundo

Para reduzir o sinal de fundo dos substratos de celulose foi necessário submetê-los a um procedimento de redução de sinal de fundo que consiste primeiramente em uma etapa de lavagem com água em extrator Soxhlet (duração de duas horas). Após secagem sob lâmpada infra-vermelha (30 min), os papéis foram cortados em círculos de 18 mm de diâmetros, os quais foram expostos à radiação ultravioleta em um reator fotoquímico (Figura 5b) por duas horas. Esse procedimento foi adaptado de Cardoso *et. al*²⁴.

3.3.2. Procedimento geral para medição do sinal fosforescente

Para a medição da fosforescência, volumes de 5 μ L das seguintes soluções foram depositados na superfície do substrato sólido, com o auxílio de micropipeta, necessariamente nesta ordem: solução de surfactante (quando necessário), solução de sal de metal pesado (quando utilizado) e solução de amostra ou branco (Figura 7). Uma planilha demarcada para indicação de posição de amostra foi usada para auxiliar esse procedimento.

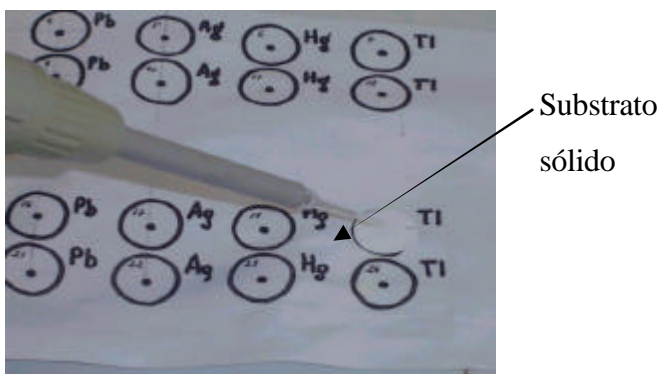


Figura 7: Aplicação das soluções no substrato sólido com auxílio de planilha demarcada para indicação de posição de amostra.

Os substratos sólidos onde foram depositadas as soluções foram então deixados para secar sob vácuo em dessecador (coberto com papel alumínio para evitar possíveis efeitos de degradação do analito pela luz ambiente) por um período de duas horas. No momento da medição de sinal, cada substrato foi colocado em um suporte (Figura 8a), o qual foi acoplado ao aparato de medição em superfície sólida (Figura 8b) que fica no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência. O substrato foi purgado, por um período de três min, com um fluxo de nitrogênio seco direcionado na posição onde as soluções foram depositadas. Após este intervalo de tempo, e ainda sob o fluxo de nitrogênio, foram feitas as varreduras de espectro e medições das intensidades dos sinais fosforescentes.

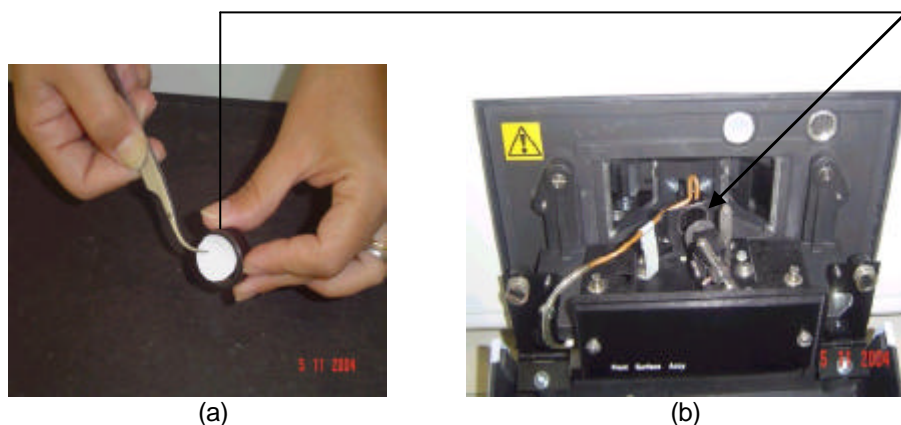


Figura 8: (a) Colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida

4. Resultados e Discussões

4.1. Otimização dos parâmetros instrumentais

4.1.1. Fosforescência em função do pH

Três diferentes meios foram testados: pH natural da solução do analito, pH ácido e pH básico. A concentração final dos analitos nas soluções foi fixada em $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e as concentrações do ácido ou da base, utilizada nas soluções com pH modificado, foram iguais a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Neste primeiro momento não foi feito, então, uso de surfactante, de sais de metais pesados e nem de radiação UV, pois o objetivo era verificar se as moléculas dos analitos já emitiriam sinal fosforescente por si sós quando imobilizadas no papel.

Após as medições de fosforescência, as médias dos resultados das triplicatas foram calculadas e se encontram na Tabela 1, onde pode ser visto que o harmine é mais sensível à variação de pH e, mesmo sem o auxílio de metais pesados e surfactante, já emite um bom sinal fosforescente em pH natural e principalmente em pH ácido (resultados em negrito). Já para o harmane, fosforescência de baixa intensidade foi observada em pH's natural e ácido. Já no pH básico, nenhuma fosforescência foi observada para ambos os compostos.

Espectros de fosforescência de ambos os compostos em pH natural e ácido encontram-se na Figura 9 e na Figura 10, respectivamente.

pH -->	$I_A - I_B \text{ (} l_{ex}/l_{em} \text{)}$		
	Natural	Ácido	Básico
Harmane	24 (251/498)	29 (251/498)	0
Harmine	473 (250/500)	630 (250/498)	0

Tabela 1: Fosforescência do harmane e do harmine em função do pH

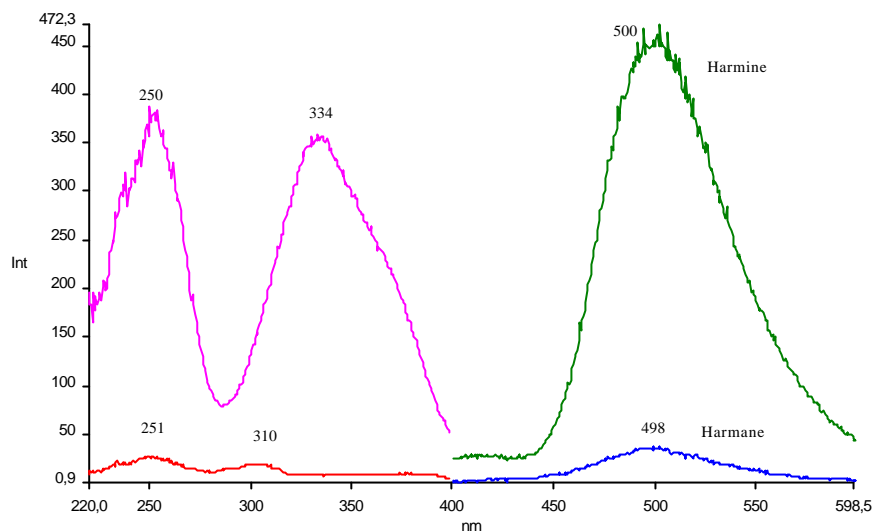


Figura 9: Espectros de fosforescência do harmane e do harmine em pH natural

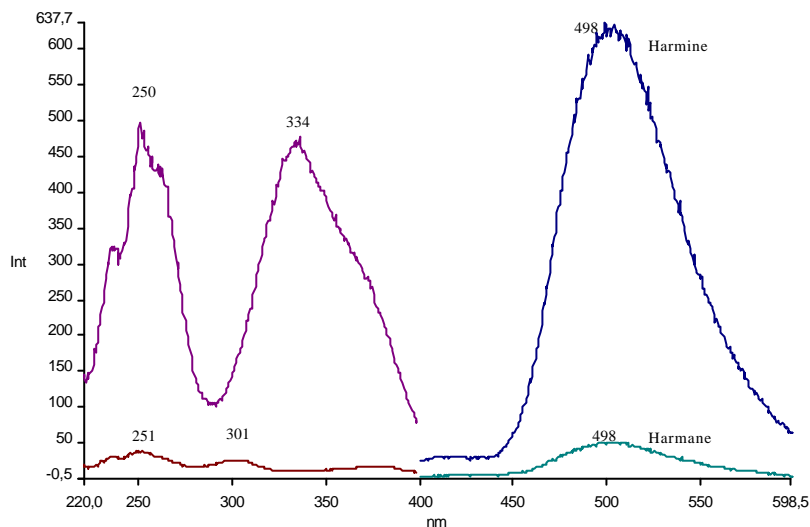


Figura 10: Espectros de fosforescência do harmane e do harmine em pH ácido

4.1.2. Fosforescência em função do efeito do átomo pesado e do pH

Seis diferentes átomos pesados (AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, TlNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, HgCl_2 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,50 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados separadamente nos substratos sólidos, sendo em seguida, depositadas soluções dos analitos preparadas nos três diferentes meios (pH ácido, pH básico e pH natural).

As médias dos resultados das triplicatas encontram-se na Tabela 2, onde os melhores sinais obtidos estão em negrito.

Para o harmane ótimos valores foram alcançados em pH natural ($\text{pH} = 7,7$), na presença dos íons Ag^+ ou Tl^+ como átomos pesados. Em meio básico os valores não foram significativos e houve formação de precipitados amarelo e marrom na presença de Hg^{2+} e Ag^+ respectivamente, impossibilitando a leitura do sinal fosforescente nestes casos. Em meio ácido, as intensidades não foram aumentadas.

A Tabela 2 também mostra que, assim como o harmane, os melhores sinais de fosforescência para o harmine são em pH natural (pH = 5,1), na presença dos íons Ag^+ (amplificação de sinal de 3,4 vezes) e Tl^+ (amplificação de sinal igual a 2,2 vezes).

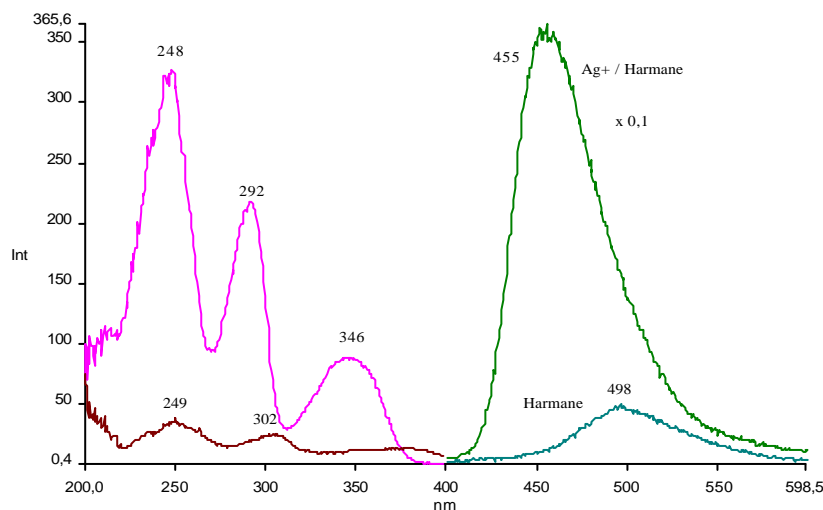
Portanto, o efeito do átomo pesado foi mais significativo para o harmane, visto que provocou uma amplificação de sinal muito maior, muito embora benefícios também fossem observados no caso do harmine.

Na Figura 11 e na

Figura 12 estão os espectros de fosforescência de ambos os compostos, em pH natural, ficando visualmente clara a importância do efeito externo do átomo pesado no aumento do sinal.

Tabela 2: Efeito do átomo pesado e do pH na fosforescência do harmane e do harmine

pH -->	$I_A - I_B$ (l_{ex}/l_{em})					
	Harmane			Harmine		
	Natural	Ácido	Básico	Natural	Ácido	Básico
Ag^+	3356 (248/455)	22 (250/504)	0	1600 (248/451)	372 (336/504)	0
Tl^+	737 (254/493)	25 (249/496)	261 (284/594)	1018 (251/494)	256 (250/500)	209 (300/596)
I^-	12 (263/494)	14 (253/507)	34 (250/501)	127 (255/490)	48 (251/502)	48 (251/595)
Hg^{2+}	0	0	0	152 (336/498)	6 (336/500)	0
Pb^{2+}	40 (301/493)	43 (301/494)	7 (301/487)	351 (335/497)	349 (330/497)	87 (336/489)
Cd^{2+}	92 (248/453)	38 (250/501)	45 (289/448)	252 (251/484)	256 (336/489)	70 (325/457)



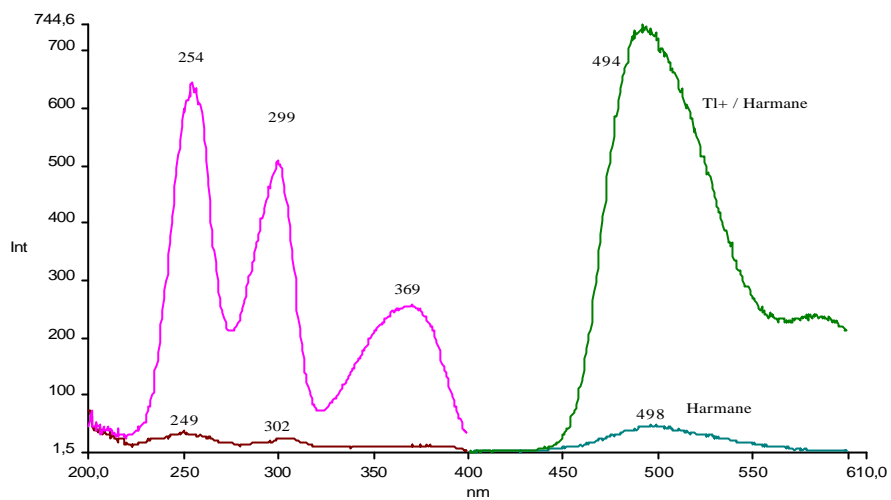


Figura 11: Espectros de fosforescência do harmane em pH natural

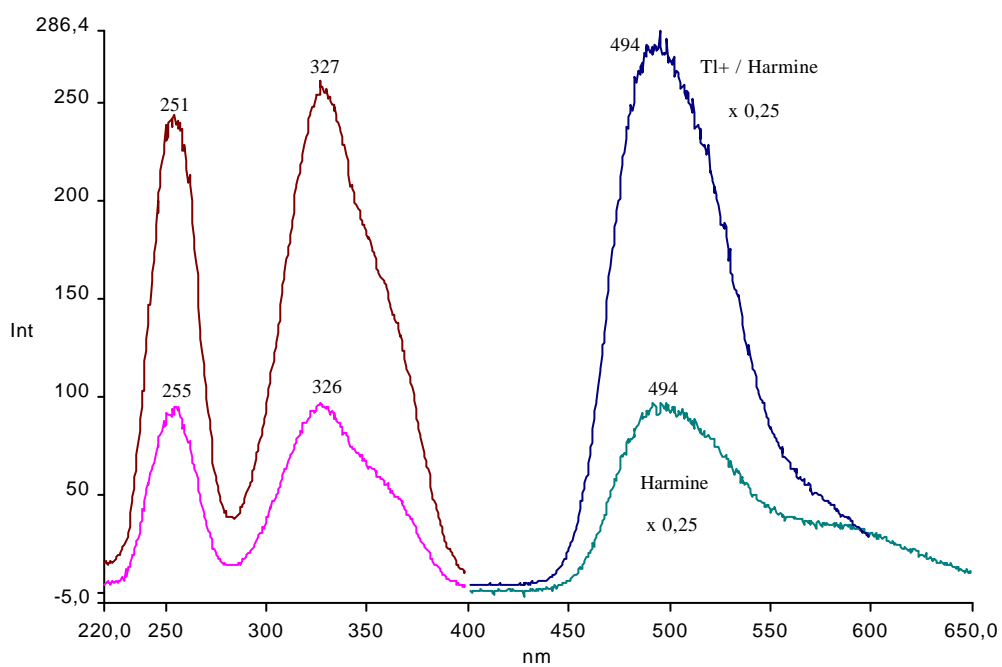
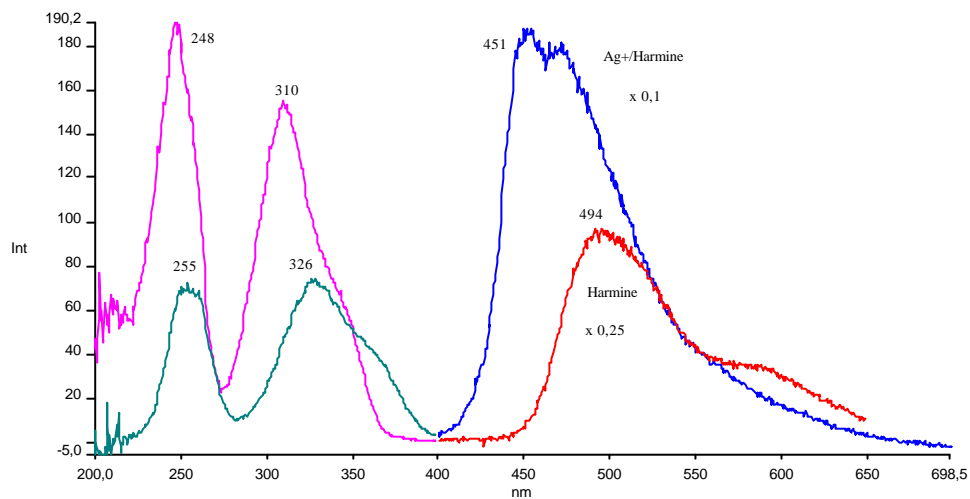


Figura 12: Espectros de fosforescência do harmine em pH natural

Na Figura 13 e na Figura 14 observa-se a influência da concentração destes sais de metais pesados na intensidade do sinal fosforescente dos dois derivados da β -carbolina no substrato de celulose.

Foi verificado que, no caso do íon Ag^+ (Figura 13), a melhor amplificação de sinal foi observada com o uso de solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, produzindo um grande aumento de sinal em ambos os compostos (principalmente para o harmane). Para maiores concentrações de Ag^+ observou-se a queda sistemática de sinal, o que era esperado, pois a prata tende a sofrer oxidação ao longo do período de duas horas em que o substrato sólido fica no dessecador formando uma camada marrom (óxido de prata) que filtra a radiação de excitação incidente.

Para o íon Tl^+ , a tendência de aumento de sinal foi diretamente proporcional ao aumento da concentração molar de TlNO_3 depositado no substrato. Assim, os melhores resultados foram obtidos com o uso das soluções $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (concentração máxima em que se consegue dissolver o sal de tálio), sendo este efeito muito mais visível para o harmine (Figura 14).

Assim, baseado nos resultados destes experimentos, escolheu-se as soluções de Ag^+ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e de Tl^+ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ para o desenvolvimento dos métodos para o harmine e para o harmine.

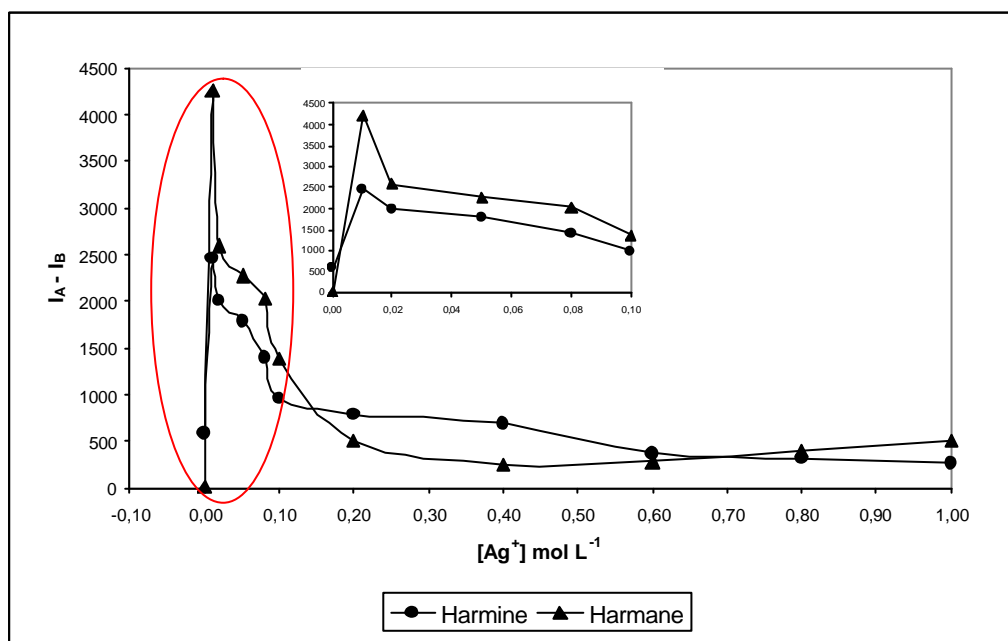


Figura 13: Influência da concentração do íon Ag^+ no sinal fosforescente do harmane (a 254/453 nm) e do harmine (a 248/450 nm), em pH natural.

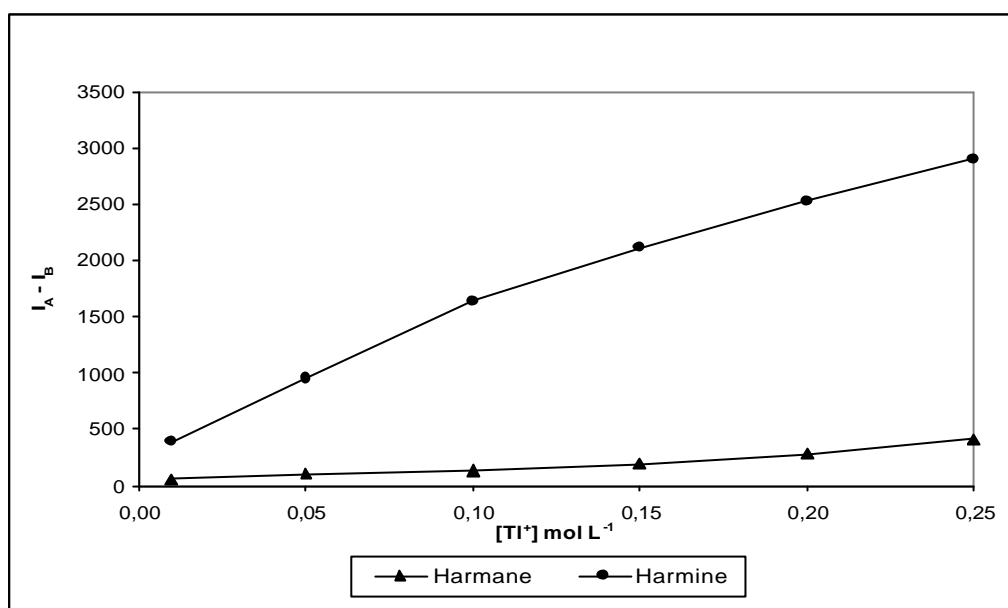


Figura 14: Influência da concentração do íon Tl⁺ no sinal fosforescente do harmane (a 261/490 nm) e do harmine (a 254/492 nm), em pH natural.

Foi feito também um ajuste fino do pH pela medição dos sinais fosforescentes de soluções de harmane e harmine preparadas em meio tamponado (pH's entre 2,5 e 12).

Os resultados desse estudo podem ser vistos na

Figura 15 e na Figura 16. Na presença do íon Ag⁺ (

Figura 15), observa-se um aumento de sinal com o aumento do pH para os dois analitos. No caso do harmine, o sinal máximo ocorre em pH em torno de 9, diminuindo em seguida devido à formação de precipitado branco a partir do pH 10. Para o harmane, o aumento de sinal acontece até o pH em torno de 11 mantendo-se estável até pH=12, de onde provavelmente, de acordo com o indicado nos estudos preliminares, diminuiria em meio mais básico. Com o uso do íon Ag^+ , os pH's 9 e 12 foram selecionados para o harmine e para o harmane respectivamente.

Quando o íon de metal pesado foi o Tl^+ (Figura 16), a variação do pH não provocou alterações significativas nos sinais do harmane; assim, o pH natural (7,7) foi escolhido nesse caso.

Assim, concluiu-se que os melhores valores de pH para se trabalhar quando o metal pesado é a prata, são 12 e 9, para o harmane e o harmine, respectivamente. Quando é utilizado tálio, o pH natural foi melhor para ambos os compostos.

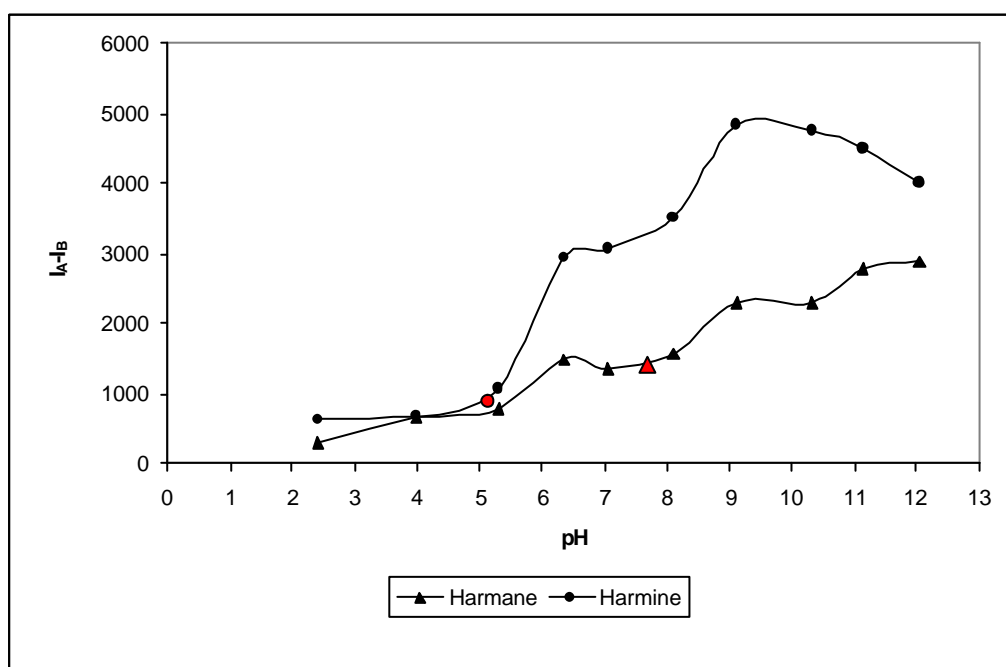


Figura 15: Influência do pH no sinal fosforescente do harmane $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} / \text{Ag}^+ 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e do harmine $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} / \text{Ag}^+ 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, a 250/455 nm e 247/451 nm, respectivamente. Os pontos em vermelho correspondem ao pH natural.

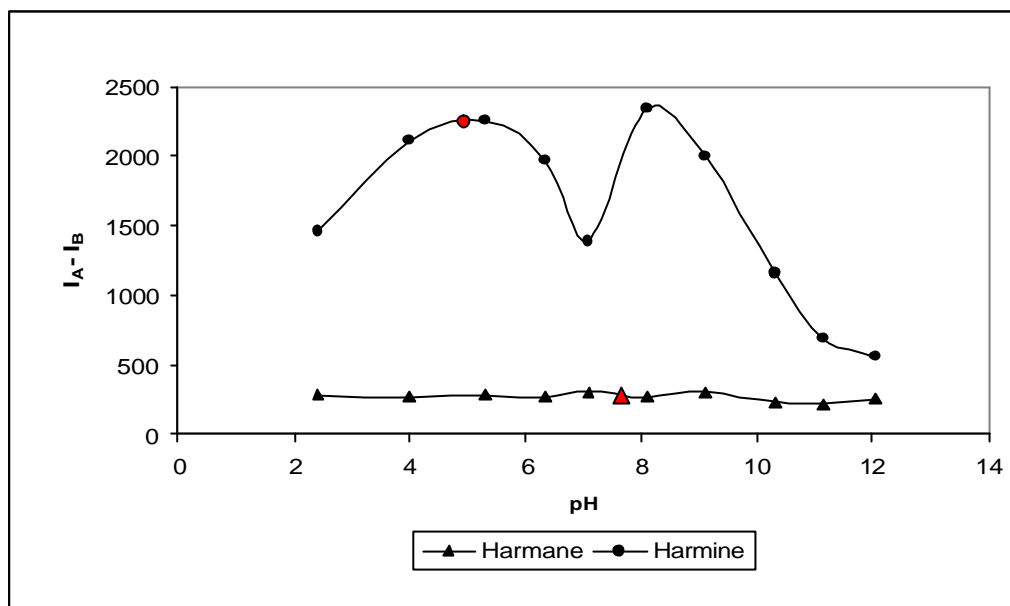


Figura 16: Influência do pH no sinal fosforescente do harmane $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} / \text{Tl}^{+} 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e do harmine $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} / \text{SDS } 0,2 \text{ mol L}^{-1} / \text{Tl}^{+} 0,25 \text{ mol L}^{-1}$, a 254/493 nm e 251/490 nm, respectivamente. Os pontos em vermelho correspondem ao pH natural.

4.1.3. Efeito do SDS como modificador de superfície do substrato de celulose

Para verificar tal efeito, uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada no substrato de celulose previamente à adição da solução do analito. As médias das medições (em triplicata) de fosforescência podem ser vistos na Tabela 3.

Comparando-se com os sinais observados sem a aplicação de SDS, houve uma grande redução das intensidades emitidas nas três faixas de pH (principalmente para o harmine) quando o SDS foi usado. Esse efeito é mostrado nos espectros na Figura 17 e na Figura 18, o que se permite concluir que o uso do surfactante para estes analitos não foi favorável.

pH -->	$I_A - I_B$ (I_{ex} / I_{em})		
	Natural	Ácido	Básico
SDS + Harmane	14 (250/500)	0	0
SDS + Harmine	45 (251/501)	25 (250/501)	0

Tabela 3: Efeito do surfactante, associado à influência do pH, no sinal fosforescente do harmane e do harmine

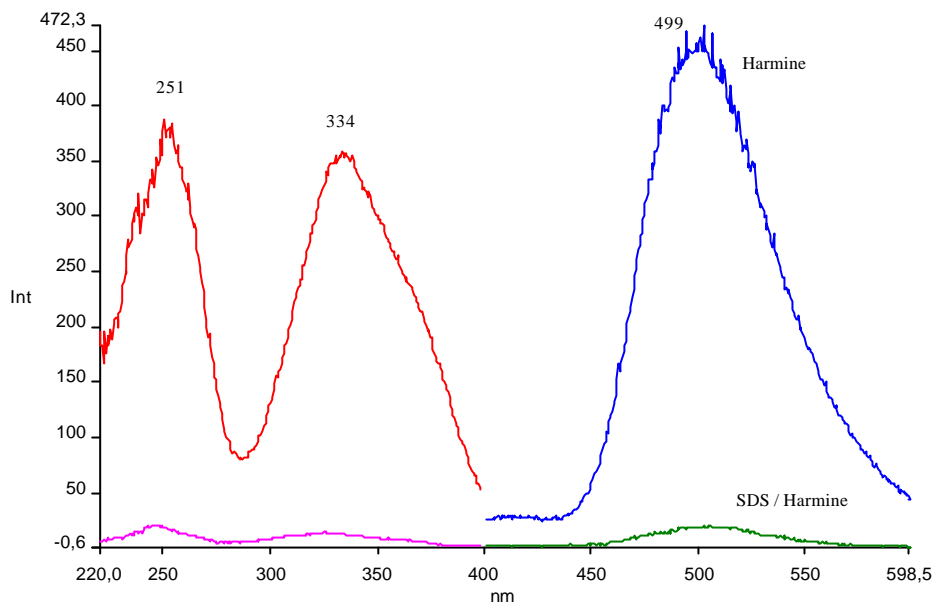


Figura 17: Espectros de fosforescência do harmine, em pH natural, com e sem uso do SDS

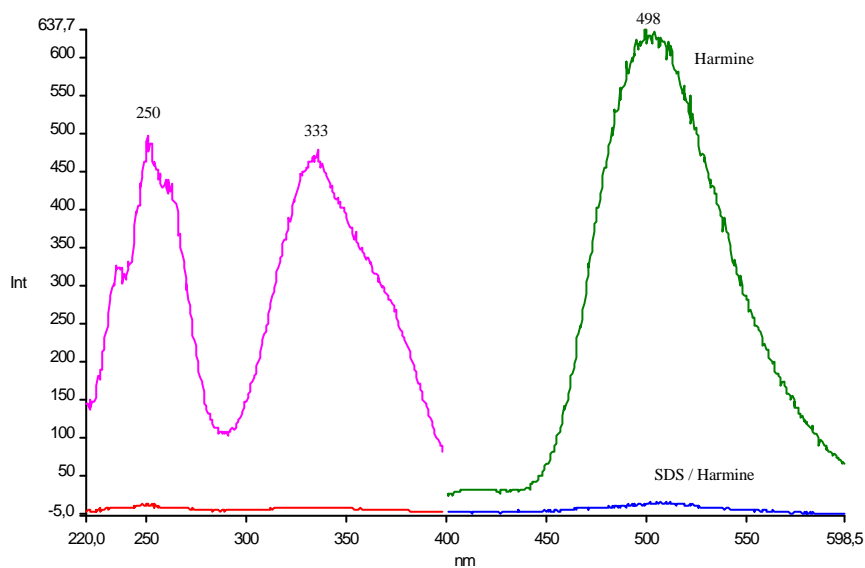


Figura 18: Espectros de fosforescência do harmine, em pH ácido, com e sem uso do SDS

4.1.4. Efeito do SDS como modificador de superfície do substrato de celulose associado à variação de pH e na presença de diferentes íons de átomo pesado

Testes foram realizados para verificar a influência do uso do SDS, associado à variação do pH na presença de diferentes íons de átomo pesado.

Os resultados (médias das triplicatas) encontram-se na Tabela 4.

Mesmo com o uso de íons de metais pesados, o surfactante também reduziu significativamente os sinais fosforescentes de ambos os derivados da β -carbolina. Comparando com os valores obtidos sem o uso do surfactante (Tabela 2), no caso do harmine em pH natural, o sinal foi 47,9 vezes menor quando utilizamos SDS/Ag⁺ e 3,6 vezes menor quando utilizamos SDS/Tl⁺. Para o harmine, também em pH natural, a redução foi de 51,6

vezes para a situação SDS/Ag⁺ e de 3,7 para SDS/Tl⁺. Os espectros destes resultados podem ser visualizados na

Figura 19 e na Figura 20.

pH -->	$I_A - I_B$ (I_{ex}/I_{em})					
	Harmane			Harmine		
	Natural	Ácido	Básico	Natural	Ácido	Básico
SDS + Ag ⁺	70 (248/451)	4 (250/503)	0	31 (246/481)	36 (334/500)	0
SDS + Tl ⁺	206 (254/491)	9 (249/498)	87 (284/594)	278 (254/494)	99 (252/501)	82 (300/596)
SDS + I ⁻	13	0	11 (250/597)	33 (252/491)	91 (255/497)	19 (250/597)
SDS + Hg ²⁺	0	0	0	0	28 (331/498)	0
SDS + Pb ²⁺	0	0	0	21 (328/497)	34 (331/496)	0
SDS + Cd ²⁺	15 (252/494)	2 (249/501)	12 (302/461)	15 (251/490)	96 (252/497)	13 (243/494)

Tabela 4: Influência do agente surfactante, associado ao efeito do átomo pesado e do pH, no sinal fosforescente do harmane e do harmine

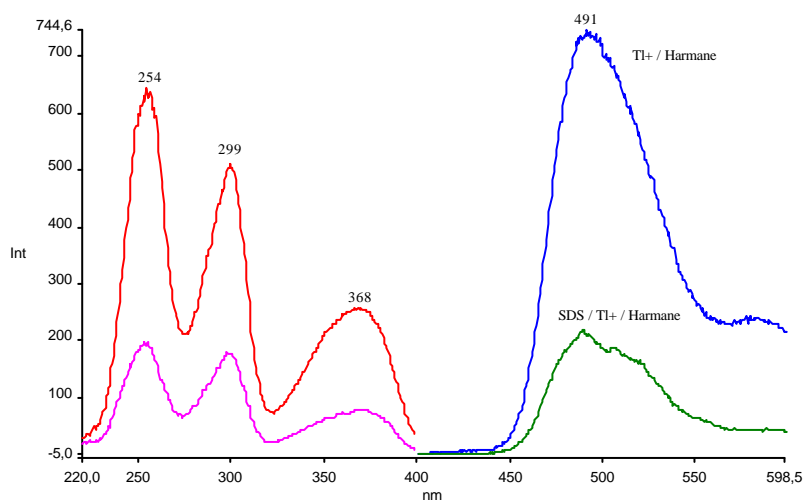
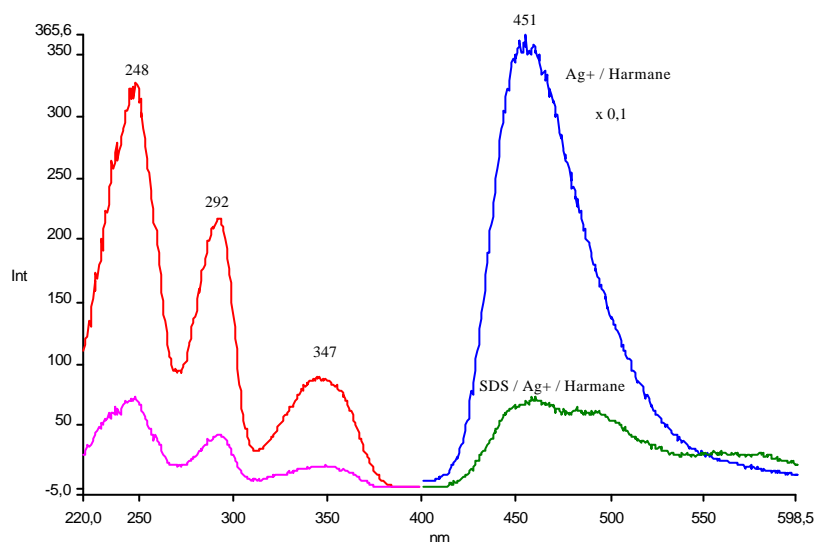


Figura 19: Efeito do SDS associado ao metal pesado, em pH natural, para o harmane

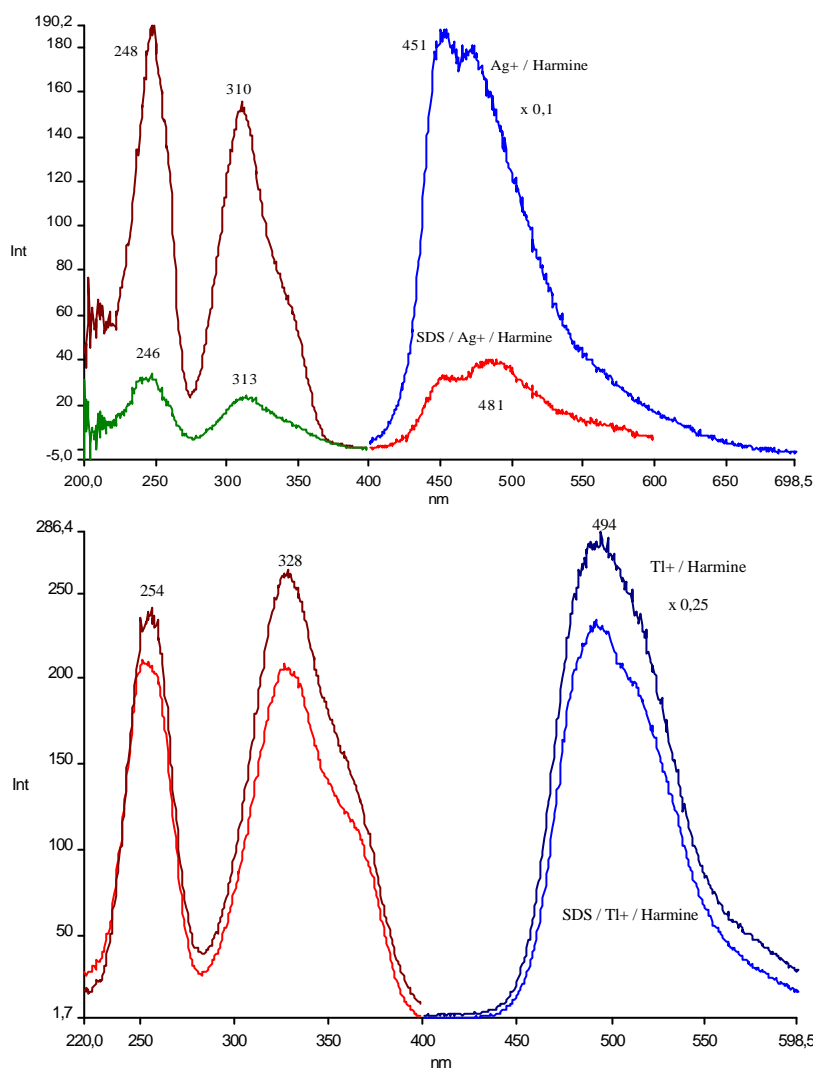


Figura 20: Efeito do SDS associado ao metal pesado, em pH natural, para o harmine

Embora não se tenha observado efeito benéfico do uso de SDS ($0,07 \text{ mol L}^{-1}$) no sinal fosforescente durante os testes preliminares feitos para os dois derivados de β -carbolinas, um estudo mais detalhado utilizando soluções de SDS de diferentes concentrações molar foi realizado conjuntamente com o uso dos íons Tl^+ ou Ag^+ .

Quando foi utilizado o íon Ag^+ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como íon de metal pesado, observou-se uma acentuada queda nos sinais fosforescentes dos analitos com o uso de qualquer quantidade de SDS (Figura 21) depositado no substrato. Já no caso do Tl^+ ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), o comportamento foi muito diferente, dependendo do analito. No caso do harmane, a presença do SDS, em qualquer das quantidades usadas, parece não afetar significativamente o sinal

fosforescente. Por outro lado, no caso do harmine, o sinal fosforescente observado foi muito dependente da quantidade de SDS utilizado, aumentando inicialmente até atingir um máximo com $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, decrescendo a partir deste ponto, provavelmente devido a um efeito filtro causado pelo excesso de SDS (Figura 22).

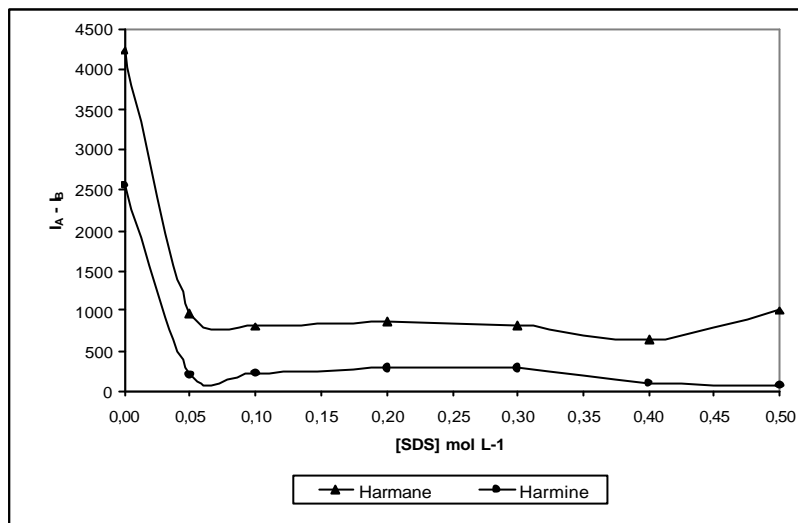


Figura 21: Efeito da concentração do surfactante (SDS), associado ao efeito do Ag^+ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, em pH natural, na emissão fosforescente do harmane e do harmine

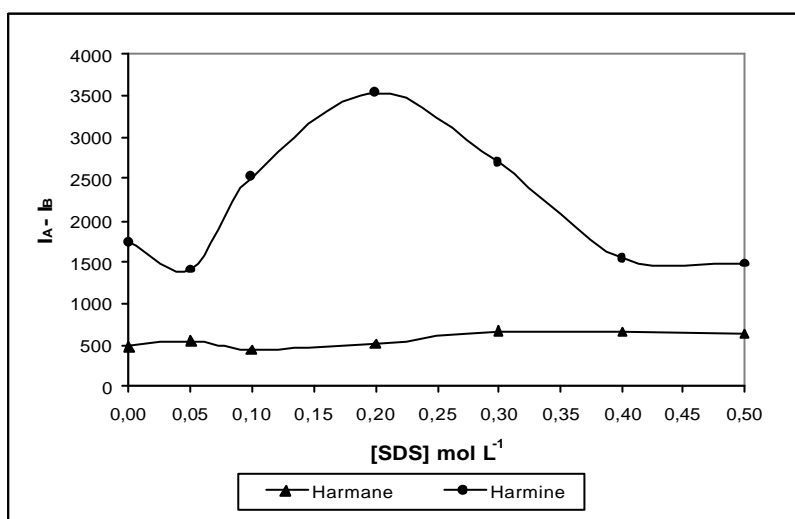


Figura 22: Efeito da concentração do surfactante (SDS), associado ao efeito do Tl^+ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, em pH natural, na emissão fosforescente do harmane e do harmine

4.1.5. Efeito da fosforescência após tratamento fotoquímico

Nesse estudo, as soluções de harmane e harmine e seus respectivos brancos foram submetidos ao tratamento com radiação UV por 30 min antes da deposição no substrato de celulose. Verificou-se que a radiação UV não afeta o sinal fosforescente dos mesmos (podendo-se concluir que não ocorreu nenhum tipo de derivação fotoquímica).

4.1.6. Parâmetros analíticos de mérito (PAM)

Curvas de resposta entre a concentração da solução de analito (ou quantidade de analito) depositada no substrato e o sinal fosforescente medido (curvas analíticas) do harmane e do harmine foram construídas utilizando as duas condições experimentais otimizadas que apresentaram máximo sinal fosforescente, onde cada ponto da curva é a média de seis medições obtidas nos comprimentos de onda máximos, que por sua vez, não variaram significativamente em função da variação da concentração em nenhum dos casos.

As curvas analíticas para o harmane e para o harmine podem ser observadas na Figura 23 e Figura 24. As faixas lineares que foram observadas, mesmo que sejam em duas etapas, permitem a análise efetiva de soluções dos analitos entre pelo menos $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em quase todos os casos. Muito embora coeficientes de correlação linear de até 0,94 tenham sido observados, esses valores são considerados adequados para a técnica FTASS, que lida com medição em superfície e seus erros associados, são comumente reportados na literatura.

Um resumo dos parâmetros relacionados com a linearidade dos métodos pode ser visualizado na Tabela 5.

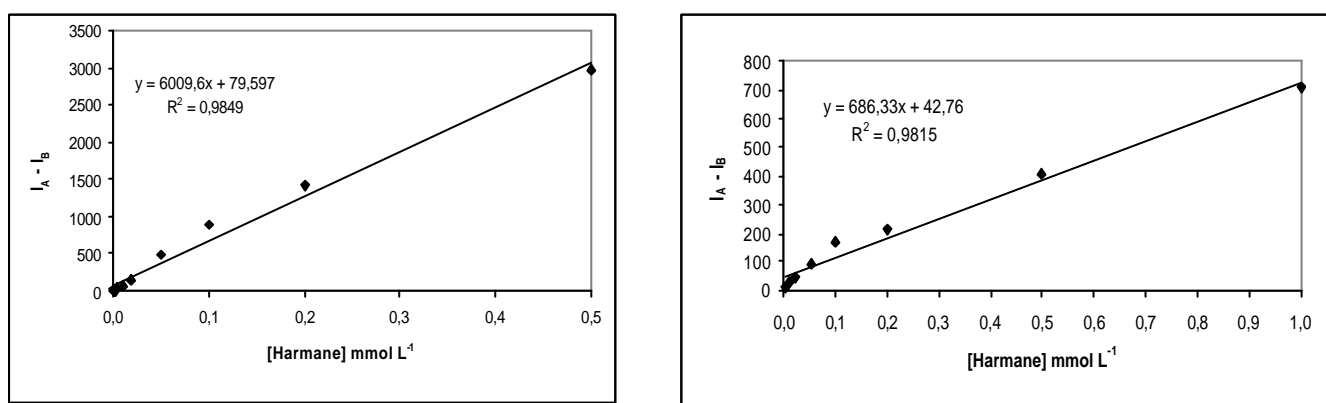
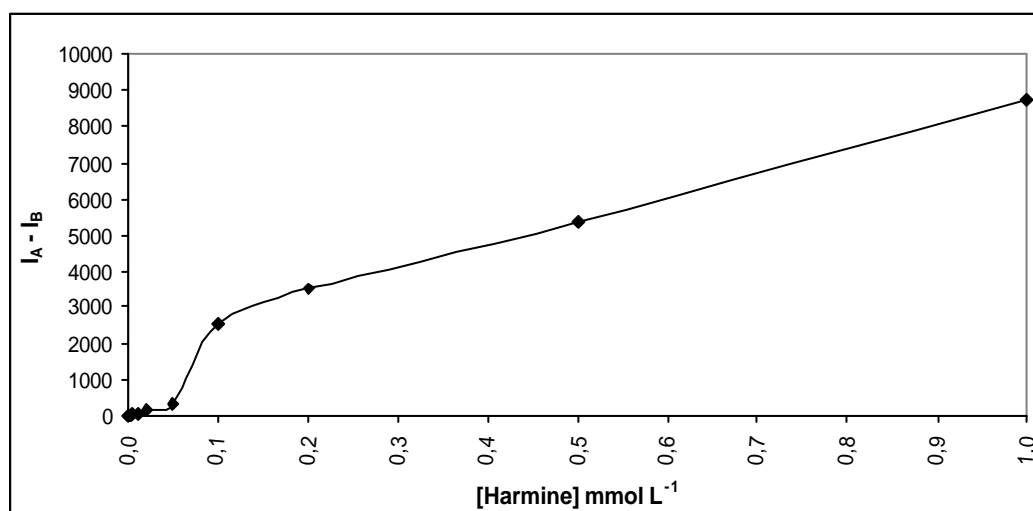


Figura 23: Curva analítica do harmane em (a) pH 12 e com Ag⁺ e (b) pH natural e com Tl⁺



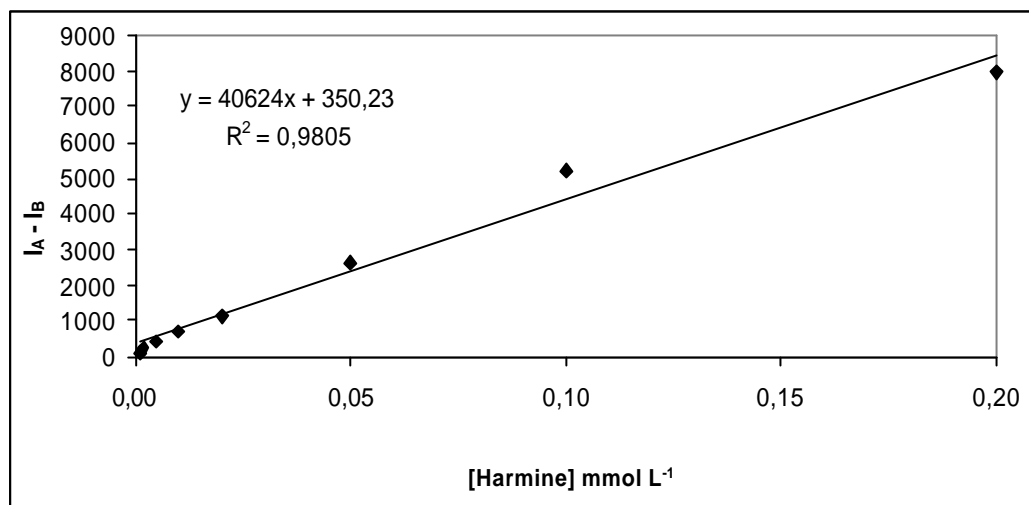


Figura 24: Curva analítica do harmine em (a) pH 9 e com Ag⁺ e (b) pH natural e com SDS/Tl⁺

Tabela 5: Parâmetros analíticos de mérito (PAM) para o harmane e o harmine

Harmane			
Condição experimental	Ag ⁺ /pH 12		Tl ⁺ / pH natural
$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	248/452		254 / 488
Equação da curva analítica	$y = 6009,6 x + 79,597$		$y = 686,33 x + 42,76$
Faixa linear dinâmica (ng)	0,39 – 456		8,10 – 911
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9849		0,9815
Desvio padrão	0,26		0,61
Harmine			
Condição experimental	Ag ⁺ /pH 9		SDS /Tl ⁺ / pH natural
$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	248/450	248/450	254 / 488

Equação da curva analítica	$y = 6855,3 x + 6,195$	$y = 7788,5 x + 1208$	$y = 40624 x + 350,2$
Faixa linear dinâmica (ng)	0,59 - 62,2	62,2 - 1244	0,53 - 249
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9984	0,9371	0,9805
Desvio padrão	0,33	0,33	1,71

A sensibilidade dos métodos desenvolvidos para o harmane e para o harmine foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção absoluto (LDA) e dos limites de quantificação absoluto (LQA). Esses parâmetros (dados pelas Equações 1 e 2) permitem avaliar a sensibilidade em termos de massa de analito depositadas no substrato.

$$LDA = (3 S_b / m) \cdot V \cdot MM \quad (1)$$

$$LQA = (10 S_b / m) \cdot V \cdot MM \quad (2)$$

Nestas equações, S_b é o desvio padrão da medição de sinal de 10 brancos, m é a sensibilidade da curva analítica em mol L^{-1} , V é o volume de amostra aplicado (5×10^{-6} L) e MM é a massa molar do analito em g mol^{-1} .

Conforme mostra a Tabela 6, os LDA e LQA para o harmane e para o harmine foram estimados usando as duas condições experimentais selecionadas para cada analito. Para o harmane, os resultados mais sensíveis foram obtidos com Ag^+ , enquanto que para o harmine os resultados mais sensíveis foram com o uso de Ti^+ /SDS. Estes limites de detecção absolutos foram da ordem de sub-nanograma.

Tabela 6: Parâmetros de mérito de sensibilidade para o harmane e o harmine

Harmane		
Condição experimental	Ag^+ /pH 12	Ti^+ / pH natural
$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)	248/452	254 / 488
Limite de detecção (ng)	0,12	2,43
Limite de quantificação (ng)	0,39	8,10
Harmine		
Condição experimental	Ag^+ /pH 9	SDS / Ti^+ / pH natural
$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)	248/450	254 / 488

Limite de detecção (ng)	0,18	0,16
Limite de quantificação (ng)	0,59	0,53

A precisão das medições foi avaliada pela repetitividade, que é o parâmetro que avalia o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas em uma mesma amostra sob as mesmas condições (mesmo instrumento, mesmo operador). O valor da precisão foi expressa através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR).

Para esse cálculo de repetitividade volumes de 5 μL de solução de analito (harmine ou harmine) de concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram depositadas em quatro grupos (dois de harmine e dois de harmine) de dez substratos de celulose. Cada grupo está relacionado com uma das condições experimentais estabelecidas. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de mérito relacionados com a precisão (repetitividade) da resposta analítica do harmine e o harmine

Harmine		
Condição experimental	$\text{Ag}^+/\text{pH } 12$	$\text{Ti}^+/\text{pH natural}$
$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} \text{ (nm)}$	248/452	254 / 488
DPR (%)	12,6	8,5
Harmine		
Condição experimental	$\text{Ag}^+/\text{pH } 9$	$\text{SDS} / \text{Ti}^+/\text{pH natural}$
$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} \text{ (nm)}$	248/450	254 / 488
DPR (%)	10,7	4,7

4.2. Determinação Seletiva

O objetivo desse estudo foi o de avaliar a seletividade da FTASS na determinação seletiva de harmine na presença de harmine e vice-versa, sem a necessidade do uso de uma técnica para separação prévia de componentes.

Foram consideradas apenas as condições experimentais já testadas, no caso o pH e efeito externo do átomo pesado e o SDS (somente para o harmine), já que o tratamento fotoquímico não trouxe modificações significantes no comportamento das duas substâncias.

4.2.1. Determinação de harmine na presença de harmane

Pela avaliação das características fosforescentes do harmane e do harmine pôde-se selecionar uma condição experimental com um bom potencial para permitir a determinação de harmine na presença de harmane. Essa condição mais favorável consiste no uso de soluções em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹) na ausência de íons de átomos pesados. Nessas circunstâncias, observa-se um sinal relativamente intenso para o harmine, enquanto que para uma mesma quantidade de harmane um sinal significativamente menor é observado (Figura 25). De fato, esse sinal do harmine pode ser ainda mais minimizado ao se escolher o comprimento de onda de excitação para o harmine em 336 nm, onde o sinal do harmane é menos intenso ainda, como pode ser visto na ampliação do espectro do harmane (Figura 26).

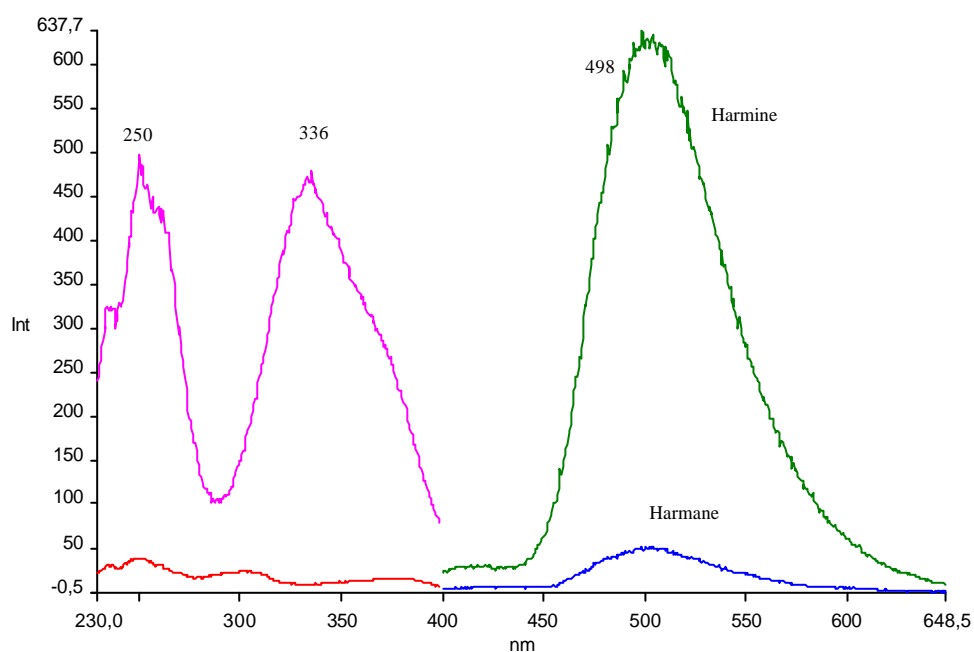


Figura 25: Sobreposição dos espectros de excitação e emissão do harmane (4×10^{-4} mol L⁻¹) e do harmine (4×10^{-4} mol L⁻¹) em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹) sem átomo pesado

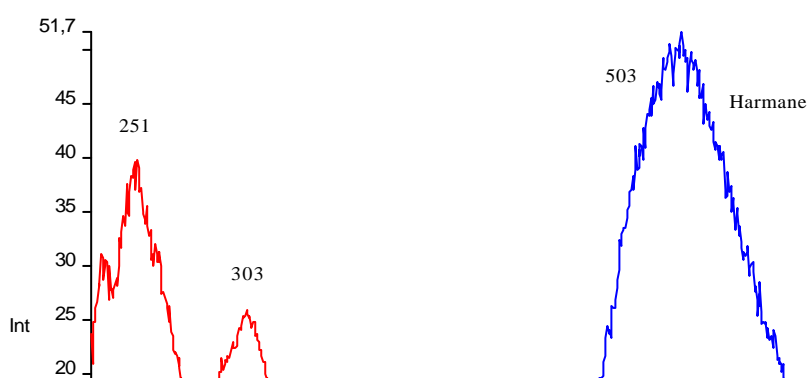


Figura 26: Espectros de excitação e emissão do harmane 4×10^{-4} mol L⁻¹ em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹)

4.2.2. Determinação de harmane na presença de harmine

No caso da seleção de condições para determinação de harmane na presença de harmine, a tarefa se mostrou bastante difícil, pois não se pode identificar claramente uma condição experimental onde o sinal do harmane seja observado na ausência de sinal do harmine. Em vista disso, fez-se uma tentativa levando em consideração a variação da posição dos picos de excitação de harmane e de harmine nas presenças de Tl⁺ e de Ag⁺. A partir dos resultados da Tabela 2 e observando comparativamente os espectros do harmane e do harmine em pH natural na presença de Ag⁺ (

Figura 27) e em pH básico na presença de Tl⁺ e SDS (Figura 28), tentou-se o uso da excitação seletiva em comprimentos de onda fixos respectivamente a 292 e 284 nm, onde tem-se um máximo de excitação para o harmane e ao mesmo tempo um mínimo de sinal para o harmine.

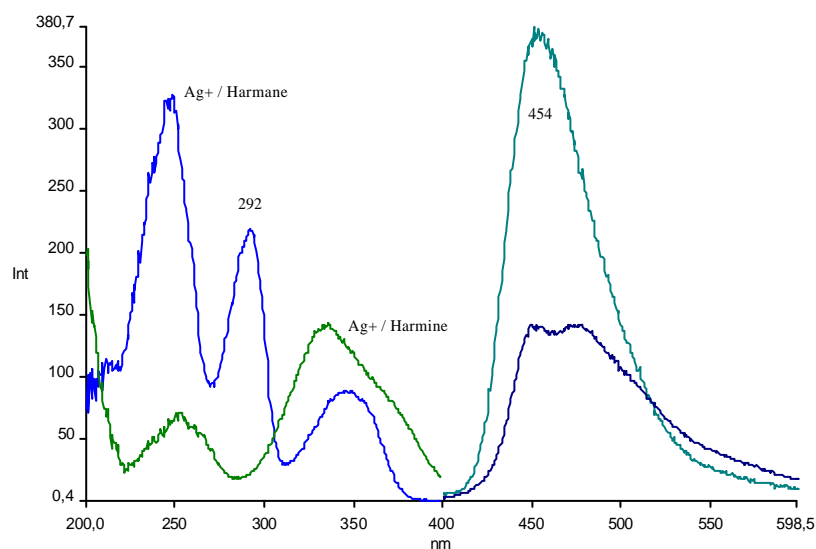


Figura 27: Sobreposição dos espectros de excitação e emissão do harmane e do harmine em pH natural, utilizando íons Ag⁺ como metal pesado

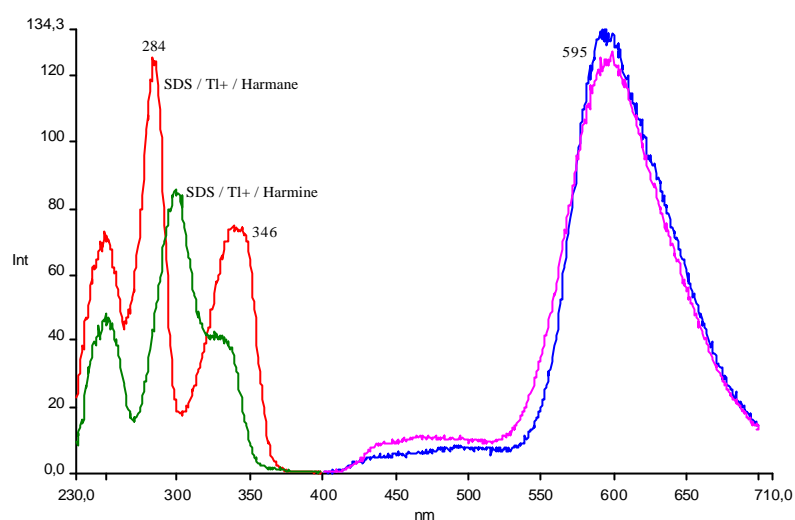


Figura 28: Sobreposição dos espectros de excitação e emissão do harmine e do harmaline utilizando a condição SDS / TI⁺ / pH básico (NaOH 0,2 mol L⁻¹)

4.2.3. Determinação de harmine na presença de harmane em urina fortificada

Foi realizado um teste de recuperação de harmine em amostras sintéticas contendo harmane. Alguns parâmetros analíticos de mérito (PAM) também foram calculados. A Figura 29 mostra a curva analítica que foi construída através de diferentes concentrações de harmine em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹) e sem o uso de metais pesados para amplificar o sinal. Os parâmetros analíticos de mérito para esta curva estão na Tabela 8, onde pode-se ver que bons resultados foram alcançados.

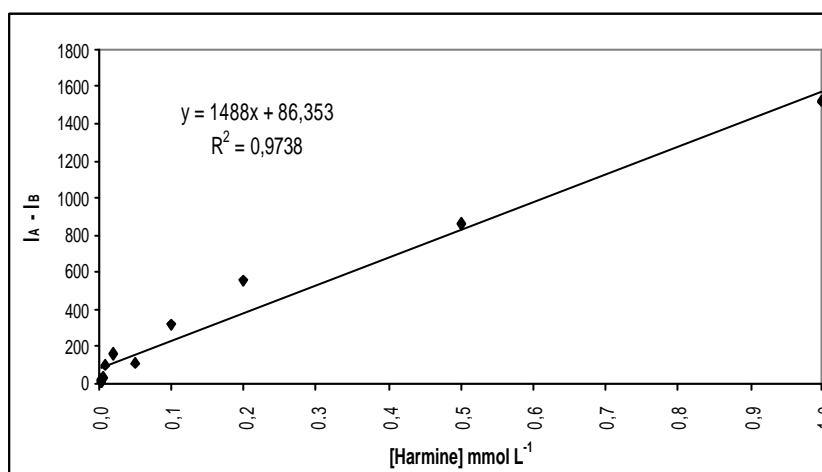


Figura 29: Curva analítica do harmine em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹), sem átomo pesado

Harmine	
Condição experimental	pH ácido (HCl 0,2 mol L ⁻¹)

$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	250 / 498
Equação da curva analítica	$y = 1488x + 86,353$
Faixa linear dinâmica (ng)	2,5– 1244
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9738
Desvio padrão	0,20
Limite de detecção (ng)	0,75
Limite de quantificação (ng)	2,5
LDR (%)	11,0

Tabela 8: Parâmetros analíticos de mérito para o harmine em pH ácido (HCl 0,2 mol L⁻¹)

O harmine não pode ser determinado em urina pelo método da curva de calibração. Sabendo disto, a determinação seletiva de harmine na presença de harmane (na proporção 1:9 v/v de harmine:harmane) em urina foi feita pelo método da adição do analito. Após repetir este experimento por três dias consecutivos e em triplicatas, a média dos valores das recuperações foi de $105,8 \pm 16,2\%$, indicando que o método tem uma boa aplicabilidade em termos de seletividade, respeitando-se os limites da proporção analito-interferente.

4.3. Determinação de harmane em chás (amostras fortificadas)

4.3.1. Determinação de harmane em chás

Três tipos de chás foram selecionados (camomila, capim cidreira e erva-doce). 1 g de cada chá foi aquecido em metanol por 15 min e uma alíquota de 2,5 mL foi separada e adicionada de solução padrão de harmane a fim de obter amostras contendo 5×10^{-6} e 5×10^{-5} mol L⁻¹ como concentração final do analito. O extrato do chá foi misturado com 7,5 mL de tampão Britton-Robinson (pH=12). As determinações foram feitas através do método da curva de calibração (Figura 30) usando substratos de celulose contendo Ag⁺ 0,01 mol L⁻¹, sendo 250 nm e 455 nm os comprimentos de onda de excitação e emissão fosforescente, respectivamente. Chás que não continham “spikes” de harmane não apresentaram FTA nas condições experimentais aplicadas. Os percentuais de recuperação encontram-se na Tabela 9, onde é possível ver que a FTASS é uma técnica que permite a determinação de harmane em diversos tipos de plantas, em especial os chás.

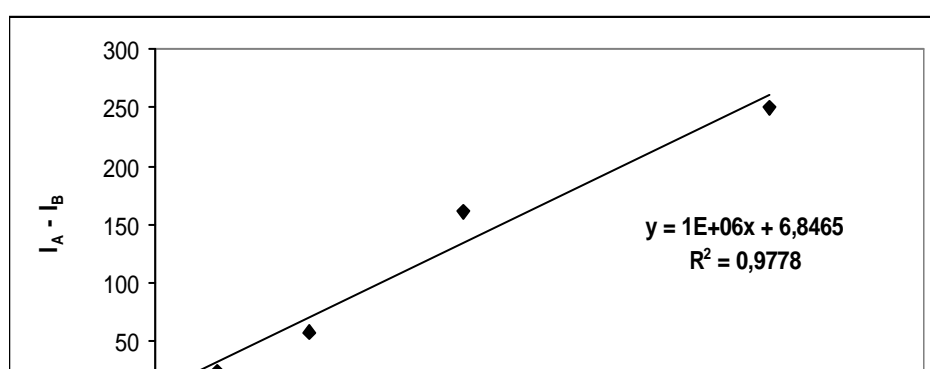


Figura 30: Curva de calibração para o harmane em solução de pH 12 e utilizando Ag^+ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Tabela 9: Testes de recuperação usando *spikes* de harmane em extratos de chás, utilizando o método da curva de calibração e varredura normal

Chá	Concentração Harmane (solução com “spike”)	Concentração experimental	% Recuperação
Camomila	$5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$4.9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	98 %
	$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$5.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	108 %
Erva doce	$5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$4.6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	92 %
	$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$4.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	96 %
Capim cidreira	$5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$4.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	90 %
	$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	100 %

4.3.2. Parâmetros analíticos de mérito (PAM)

Para as condições acima estabelecidas (vide Figura 30), obteve-se limites de detecção e de quantificação absolutos de 1,23 e 4,10 ng respectivamente (para 5 μL de amostra). A curva analítica mostrou uma faixa linear que cobre um intervalo de massa entre 1,82 ng e 182,22 ng de analito. Estes e os demais parâmetros analíticos de mérito encontram-se na Tabela 10, onde podemos concluir que há a possibilidade da determinação de harmane em chás, obtendo percentuais de recuperação em torno de 100%.

Tabela 10: Parâmetros analíticos de mérito (PAM) relacionados com a linearidade, sensibilidade e precisão (repetitividade) da resposta analítica para o harmane

Harmane (pH 12 e Ag⁺ 0,01 mol L⁻¹)	
$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	250/455
Equação da curva analítica	$y = 1 \times 10^{-6} X + 6,8465$
Faixa linear dinâmica (ng)	1,82 – 182,22
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9778
Desvio padrão	0,45
Limite de detecção (ng)	1,23
Limite de quantificação (ng)	4,10
DPR (%)	11,10

5. Conclusões

A partir de estudo sistemático das características fosforescente do harmane e do harmine, foram selecionadas e otimizados parâmetros instrumentais para a eficácia da técnica. O pH do meio onde a solução dos analitos foram preparadas assim como a presença de íons de átomos pesados no substrato sólido, principalmente a prata e o tálio, permitiu substanciais aumentos das emissões fosforescentes dos compostos estudados. Os parâmetros experimentais otimizados para a obtenção de maior sinal fosforescente foram o pH, a concentração do íon de átomo pesado e a concentração de surfactante depositada no substrato.

O estudo inicial que visa a determinação seletiva de harmine na presença de harmane e vice-versa também se mostrou bastante promissor. Tomando como referência apenas as características fosforescentes estudadas inicialmente, verificou-se a viabilidade da determinação de harmine na presença de harmane em concentrações até 10 vezes maiores.

O desempenho analítico da metodologia foi avaliado pelo cálculo dos parâmetros analíticos de mérito.

6. Trabalhos Futuros

Estudos futuros neste sentido serão realizados para definir as situações que proporcionarão a determinação seletiva efetiva destes compostos na presença de outros derivados da β -carbolina, incluindo nesse caso também o harmaline, o harmol e o harmalol. Para tal, será necessário, além de condições experimentais otimizadas, o uso das técnicas para aumento da seletividade tais como a fosforimetria a 77 K, varredura sincronizada, espectrometria de luminescência resolvida no tempo e fosforimetria derivada superior (d^H).

7. Referências

- ¹ MEESTER, C. *Genotoxic potential of b-carbolines: a review*. Mutation Research, v. 339, p. 139-153, 1995.
- ² AIRAKSINEN, M.M. e KARI, I.. *Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: Occurrence, origin and metabolism*. Med. Biol., v. 59(1), p. 21-34, 1981.
- ³ LOUIS, E.D.; ZHENG, W.; JUREWICZ, E. C.; WATNER, D.e CHEN, J.. *Elevation of blood b-carboline alkaloids in essential tremor*. Neurology, v. 2(2), p. 1940, 2002.
- ⁴ SOBHANI, A. M.; EBRAHIMI, S. e MAHMOUDIAN, M.. *An in vitro evaluation of human DNA Topoisomerase I Inhibition by Peganum harmala L. Seeds extract and its b-carboline alkaloids*. J. Pharm. Sci., v. 5(1), p. 18, 2002.
- ⁵ GIORGIO, C., DELMAS, F., OLLIVIER, E.,ELIAS, R., BALANSARD, G. e DAVID, P.. *In vitro activity of the b-carboline alkaloids harmane, harmine and harmaline toward parasites of the species Leishmania infantum*. Exp. Parasit., v. 106, p. 67-74, 2004.
- ⁶ KARTAL, M.; ALTUN, M. L. e KURUCU, S.. *HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the sees of Peganum harmala L.* J. of Pharmac. And Biomed. Analys., v. 31, p. 263, 2003.
- ⁷ CAO, R.; CHEN, Q.; HOU, X.; CHEN, H.; GUAN, H.; Ma, Y.; PENG, W. e XU, A.. *Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted b-carboline derivatives*. Bio. Med. Chem., v. 12, p. 4613-4623, 2004.
- ⁸ KATZUNG. B. G.. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 332, 1994.
- ⁹ WAKABAYASHI, K.; TOTSUKA, Y.; FUKUTOME, K.; OGURI, A.; USHIYAMA, H. e SUGIMURA, T.. *Human exposure to mutagenic / carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic b-carbolines*. Mutation Research, v. 376, p. 253-259, 1997.
- ¹⁰ HERRAIZ, T. *Tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid compounds in fish and meat: possible precursors of co-mutagenic beta-carbolines norharman and harman in cooked foods*. Food Addit. Contamin., v. 178, p. 59-66, 2000.
- ¹¹ MARQUES, A. D. S.; SOUZA, H. F., COSTA I.C. e AZEVEDO, W. M.. *Spectroscopic study of harmane in micelles at 77 K using fluorescent probes*. J. of Molec. Struct., v. 520, p. 179-190, 2000.
- ¹² CONOVA, S.. *Stopping Essential Tremor. New research begins to track down causes of the disease*. In Vivo - Neurolog. Disorder, v. 2(2), p. 30, 2004.
- ¹³ HURTUBISE, Robert J. *Phosphorimetry. Theory, Instrumentation and Applications*. VHC: New York, 1990.
- ¹⁴ VO-DINH, T. *Room Temperature Phosphometry for Chemical Analysis*. Canadá: John Wiley & Sons, 1984.
- ¹⁵ HARRIS, D. C.. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 5ª ed, 2001.
- ¹⁶ KUIJT, J.; ARIESE, H.; BRINKMAN, U.A.TH. e GOOIJER, C. *Anal. Chim. Acta*, p. 488, 135-171, 2003
- ¹⁷ WILLARD, H.; MERRITT JR, L. e DEAN, J. *Análise Instrumental*, 5ª edição, Nova Iorque, 1974

-
- ¹⁸ SCHULMAN, S. G.. *Molecular Luminescence Spectroscopy – Methods and Applications – Part I*. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- ¹⁹ LASERNA, J. J., CABALÍN, L. M. e RUPÉREZ, A. *Solid surface room-temperature phosphorescence analysis of banned substances in sport*. *Anal. Chim. Acta*, v. 270, p. 239, 1992.
- ²⁰ SCHULMAN, S. G.. *Molecular Luminescence Spectroscopy – Methods and Applications – Part I*. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- ²¹ FIDANZA, J. e AARON, J. J.. *Evaluation of filter papers as substrates for solid-surface room-temperature fluorimetry and photochemical fluorimetry*. *Talanta*, v. 33 (3), p. 215-218, 1986.
- ²² CAMPÍGLIA, A. D. e DE LIMA, G. C.. *Ibid.*, v. 59, p. 2822, 1987.
- ²³ McALEESE, D. L. e DUNLAP, R. B.. Reduction of background emission in room-temperature phosphorescence. *Anal. Chem.*, v. 56, p. 600, 1984.
- ²⁴ CARDOSO, C. E. MARTINS. R.O.R., AUCÉLIO, R.Q., "Avaliação do sinal de fundo de papéis-filtro e reavaliação de seu procedimento de redução visando seu uso como substrato sólido para fosforimetria" 27ª Reunião Anual da SBQ e XXVI Congresso Latino Americano de Química, Livro de resumo (QA 124), 2004.
- ²⁵ KASHA, M. *J. Chem. Phys.*, v. 20, p. 71, 1977.
- ²⁶ McLURE, D. S.. *J. Chem. Phys.*, v. 17, p. 905, 1949.
- ²⁷ DE LIMA, C.G., ANDINO, M.M., WINEFORDNER, J.D. *The effects of heavy-atom containing surfactants in the room-temperature phosphorescence of carbaryl*. *Anal. Chem.*, v. 58 (3), p. 2869, 1986.
- ²⁸ RODRIGUEZ, J. J. S., GARCIA J. H., FERRERA, Z. S. e LÁZARO, B. M. *Solid Surface Room Temperature Phosphorescence of polychlorinated dibenzofurans enhanced by a surface active agent*. *Anal. Letters*, v.28, p. 2413-2436, 1995.
- ²⁹ HURTUBISE, R. J. *Phosphorimetry - New developments include solid-surface, micelle-stabilized, and solution-sensitized room-temperature phosphorescence*. *Anal. Chem.*, v. 55 (6), p. 669A-680A, 1983.
- ³⁰ JABLONSKY, A.. *Molecular luminescence spectroscopy*. *Z Phys.*, v. 94, p. 38, 1935.
- ³¹ WANDRUSZKA, R. M. A. e HURTUBISE, R. J.. *Anal. Chem.*, v. 49, p. 2164, 1977.
- ³² DE LIMA, C. G. e NICOLA, M. M.. *Anal. Chem.* v. 50, p. 1658, 1978.
- ³³ MILLER, J. N.. *Room Temperature phosphorimetry – a promising trace analysis method*. *Trends in Anal. Chem.*, v. 1 (1), p. 33, 1981.
- ³⁴ GUNSHEFSKI, M., SANTANA, J. J., STEPHENSON, J. E WINEFORDNER, J. D. *Solid-surface room-temperature phosphorescence*. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 27(2), p. 143-192, 1992.
- ³⁵ CAMPÍGLIA, A.D.e DE LIMA, C.G. *Anal. Chem*, v.59, p. 2822,1987.