



CNPQ / PIBIC 06/2007

Departamento de Química

Alunos: Flávia da Silva Figueiredo (original)
Thiago Fernando Mota Gonçalves (substituto)

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio

Título do projeto: Determinação seletiva de derivados da β -Carbolina através da fosforimetria na temperatura ambiente e substrato sólido (FTASS) e eletrocromatografia capilar micelar (ECCM).

Índice

1. Introdução	3
1.1. β -Carbolinas	3
1.2. Fosforescência	5
1.3. Parâmetros que afetam o sinal fosforescente	6
1.4. Eletroforese capilar	8
2. Objetivos	10
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Instrumentação	10
3.2. Reagentes	11
3.3. Procedimentos	12
4. Resultados e Discussões	13
4.1. Determinação de harmol na presença de harmane e de harmine utilizando cloreto de mercúrio como solução de átomo pesado	13
4.2. Determinação de harmol na urina	16
4.3. Determinação de harmane em comprimido simulado	16
5. Conclusões	17
6. Referências	19

DETERMINAÇÃO SELETIVA DE DERIVADOS DA β -CARBOLINA ATRAVÉS DA FOSFORIMETRIA NA TEMPERATURA AMBIENTE E SUBSTRATO SÓLIDO (FTASS) E ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR MICELAR (ECCM)

1. Introdução

1.1. β -Carbolinas

O harmane, harmine e harmol 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

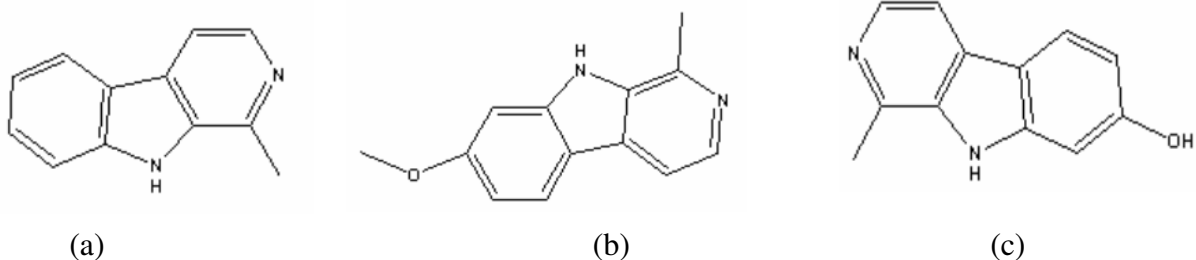


Figura 1: Estruturas do harmane (a), do harmine (b) e do harmol (c)

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, o harmine e o harmol 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 β -carbolinas

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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e em cigarros (mais de 14,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 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 bÍlis.

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 triplete de mais baixa energia, T_1 , para o estado fundamental singlete, 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 singlete puros e estados triplete, para produzir estados com características mistas em multiplicidade de spin¹⁶. O processo foto-físico descrito acima é mostrado na Figura 3.

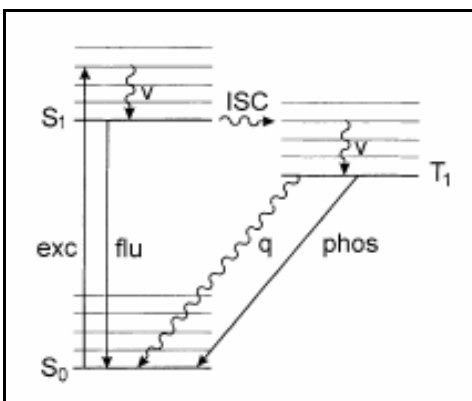


Figura 3: Representação esquemática do processo de fosforescência em temperatura ambiente. S_0 , estado singlete fundamental; S_1 , primeiro estado singlete excitado; T_1 , Primeiro estado excitado triplete; exc, excitação; flu, fluorescência; v, relaxamento vibracional; ISC, cruzamento de sistemas; 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 singlete, 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 singlete-triplete constituam processos proibidos, existe probabilidade para que ocorra a

conversão interna do estado excitado singlete para o triplete, uma vez que a energia do mais baixo nível vibracional do estado triplete é inferior à que corresponde ao estado singlete¹⁷.

A existência de moléculas no estado triplete 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 triplete – 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 os luminóforos 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 (I 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 ligininas 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 Campíglio 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 2^2 , 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-aminobenzóico 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 ϕ_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

1.4. Eletroforese capilar

O fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada.³⁵

Geralmente o funcionamento de um equipamento de eletroforese capilar (EC) envolve a aplicação de alta voltagem, tipicamente 5 a 30 kV, em um capilar de diâmetro reduzido gerando correntes na faixa de 10 a 100 mA. O uso do capilar apresenta várias vantagens, particularmente com respeito ao aquecimento Joule.³⁶

Na eletroforese capilar, o capilar é preenchido com uma solução tampão e suas extremidades são mergulhadas em recipientes, que contêm a solução tampão, e onde é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos são feitos de um material inerte, tal como, platina, e são também mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis (vide esquema simplificado na Figura 4).

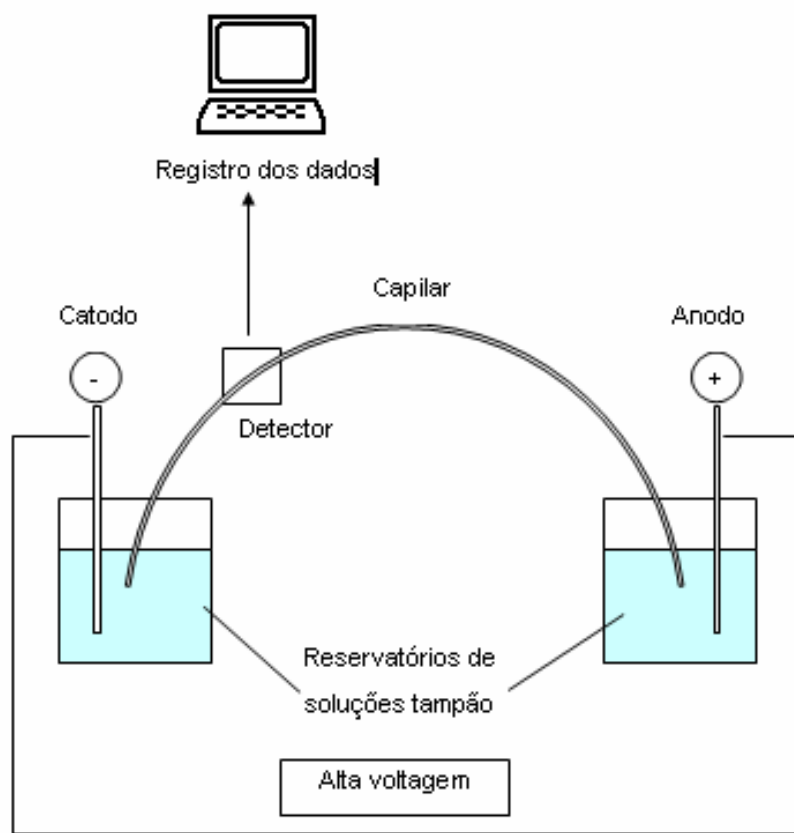


Figura 4: Representação esquemática do arranjo dos principais componentes de um instrumento típico de Eletroforese Capilar.

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na EC são disponíveis detectores que são, basicamente, a adaptação dos detectores utilizados nos equipamentos de cromatografia em meio líquido para o formato capilar.

A detecção pode ser feita de várias formas: em linha e no final do capilar. A detecção em linha é feita enquanto o soluto ainda migra dentro do capilar. Na detecção no final do capilar, como o próprio nome sugere, o detector é posicionado no final da coluna; este método apresenta a desvantagem do alargamento da banda enquanto os solutos separados são levados ao detector.

O gráfico do tempo em função de resposta do detector é denominado eletroferograma.

A **Eletrocromatografia Capilar Micelar (ECCM)** foi inicialmente desenvolvida para a resolução de compostos neutros, os quais não podem ser separados usando simplesmente a ECSL (Eletroforese Capilar em Solução Livre). Esta técnica separa as moléculas neutras e os íons. Na ausência de micelas, todas as moléculas neutras devem alcançar o detector no tempo t_0 . As micelas injetadas com a amostra alcançam o detector no tempo t_{mc} , que é maior do que o t_0 porque elas migram contra a corrente. Se uma molécula está em equilíbrio entre a solução pura e o interior das micelas, seu tempo de migração aumenta, porque ela migra na taxa mais lenta da micela em parte do tempo. Neste caso, as moléculas neutras alcançam o detector num tempo entre t_0 e t_{mc} . Quanto mais tempo a molécula leva no interior da micela, maior será o seu tempo de migração. Os tempos de migração dos cátions e ânions também são afetados pelas micelas, porque os íons se distribuem entre a solução e as micelas e interagem eletrostaticamente com as micelas.³⁷

A ECCM é uma forma de cromatografia porque as micelas se comportam como uma fase pseudo-estacionária. A separação de moléculas neutras está baseada na distribuição entre a solução e a fase “estacionária”. Neste tipo de técnica podemos usar surfactantes aniônicos, catiônicos e neutros para modificar os coeficientes de partição dos constituintes em análise. Podemos adicionar solventes como a acetonitrila e a N-metil-formamida para aumentar a solubilidade de substâncias orgânicas e modificar o coeficiente de partição entre a solução e as micelas. Também podemos adicionar ciclodextrinas, com uma cavidade opticamente ativa dentro das quais podem se encaixar pequenas moléculas, para separar os isômeros ópticos (enantiômeros) que despendem diferentes quantidades de tempo associadas com as ciclodextrinas.³⁷

Na eletroforese capilar a análise qualitativa é feita através da comparação dos tempos de migração dos padrões com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra e/ou através de espectros de UV/Vis (detector por arranjo de diodos) ou do espectro de massas (detector espectrômetro de massas). A quantificação das substâncias, com concentrações desconhecidas presentes na amostra é feita através do procedimento usual de curvas de calibração.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho é o de avaliar a Fosforimetria em Temperatura Ambiente em Substrato Sólido (FTASS) como técnica analítica para a determinação seletiva de harmane e harmol, sem a necessidade do uso da separação prévia destes componentes, e validar o método utilizando Eletrocromatografia Capilar Micelar (ECCM). O método foi desenvolvido em um espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55 com fonte pulsada de xenônio e detector do tipo tubo fotomultiplicador. Os parâmetros instrumentais selecionados foram: banda espectral de passagem (10 nm); tempo de retardo (3ms); tempo de abertura do detector (3 ms). Papel filtro previamente tratado para redução de sinal de fundo foi usado como substrato para imobilização do analito. Para comparação e validação, também foi utilizado um sistema de eletroforese capilar da Agilent.

3. Materiais e Métodos

3.1. Instrumentação

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

O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com 8 μ 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. Os parâmetros instrumentais selecionados foram: banda espectral de passagem (10 nm); tempo de retardo (3ms); tempo de abertura do detector (3 ms). Papel filtro previamente tratado para redução de sinal de fundo foi usado como substrato para imobilização do analito. 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. Este aparato foi modificado para que o nitrogênio pudesse ser purgado diretamente no substrato durante as medições.

Um reator fotoquímico 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 ($\lambda_{m\acute{a}x}$) é em torno de 300 nm. Para redução do sinal de fundo dos papéis utilizados como substratos sólidos foi necessário submetê-los a um processo de lavagem em extratores Soxhlet, seguido de secagem sob luz de lâmpada infra-vermelha de 150 W (Phillips, Brasil). Os substratos de celulose são colocados no interior do reator e recebem continuamente a irradiação das seis lâmpadas que ficam no topo do reator.

A determinação da eletrocromatografia capilar micelar foi feita em um sistema capilar de eletroforese (Agilent, EUA).

3.2. Reagentes

Papel de filtro (Whatman N° 42) tratado no laboratório para a redução do sinal de fundo foi utilizado como substrato sólido para o depósito das amostras.

A água deionizada (resistividade de 18.2 M Ω cm), obtida do Ultra Purificador de água Master System 1000 (GEHAKA, Brazil), foi usada para preparar todas as soluções aquosas.

O nitrogênio comercial (99,96 %) utilizado para purgar o interior do espectrômetro de luminescência foi adquirido na AGA (Brasil). Um sistema para desoxigenação consistiu em duas soluções em linha, cuja composição era metavanadato de amônio (Química Moura, Brasil), ácido clorídrico P.A. (Merck, Brasil), zinco em pó (Vetec, Brasil) e mercúrio metálico (F. Maia, Brasil). A secagem do nitrogênio foi feita após a passagem nas soluções desoxigenantes, forçando o fluxo de nitrogênio contra a gravidade em duas colunas de sílica (Vetec, Brasil).

Todos os reagentes eram da classe analítica e foram empregados sem purificação adicional. O metanol, a acetonitrila, a uréia, o cloreto do mercúrio (II), o iodeto de potássio, o nitrato de cádmio (II), o nitrato de sódio, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o ácido bórico, o ácido acético, o ácido fosfórico, o ácido hidrocloreídrico e o hidróxido de sódio foram comprados da Merck (Brasil).

Harmane, reserpina e cloridrato de yohimbina foram fornecidos por Sigma (EUA). O nitrato de Tálcio (I) e o nitrato de cádmio eram da Across (EUA). A talidomida e a zidovudina (AZT) foram doados por Microbiológica, Brasil. Para a simulação de uma formulação farmacêutica, utilizou-se o medicamento Talidomida CEME[®], obtido do Departamento de Saúde Pública do Distrito Federal (DSP-DF), apresentado em comprimidos para administração oral e que contém, segundo o fabricante, 100 mg de talidomida por comprimido.

3.3. Procedimentos

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 por duas horas. Este procedimento diminui em 95% o sinal de fundo do substrato de celulose e é uma adaptação de um procedimento tradicional^{16,17}, mas diminuindo o tempo de tratamento de 16 para somente 4 horas.

Metanol foi utilizado para preparar soluções estoque de harmane. Soluções padrões do analito foram feitas a partir da solução estoque avolumando com metanol/água 75/25 %, v/v. O pH das soluções do analito variou utilizando NaOH, HCl ou tampão Britton-Robinson (0,04 mol L⁻¹).

Soluções estoque de AgNO₃ 1,0 mol L⁻¹, TlNO₃ 0,25 mol L⁻¹, Pb(NO₃)₂ 0,25 mol L⁻¹, HgCl₂ 0,20 mol L⁻¹, KI 1,0 mol L⁻¹, C₄H₆CdO₄.2H₂O 0,50 mol L⁻¹ e de surfactante dodecil sulfato de sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S) 0,5 mol L⁻¹ foram feitas em balões volumétricos utilizando água ultra purificada como solvente. Quando necessário, soluções de diferentes concentrações eram preparadas a partir destas.

Para a medição da fosforescência, volumes de 5 µL das soluções padrões ou da amostra foram depositados na superfície do substrato sólido, com o auxílio de uma micropipeta, necessariamente nesta ordem: solução de surfactante (quando necessário), solução de sal de metal pesado (quando utilizado) e solução de amostra ou branco.

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, o qual foi acoplado ao aparato de medição em superfície sólida 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.

Apesar das propriedades farmacêuticas do harmane, ainda não existem medicações contendo estes compostos. Por este motivo, foi necessário simular um comprimido em laboratório para analisá-lo por FTASS. Este comprimido foi preparado pulverizando tabletes (Talidomida CEME[®]) contendo 100 mg de talidomida e misturando cada um à 60mg de harmane. Esta nova formulação foi misturada em um agitador mecânico por 1h. Seis porções do pó foram então separadas e lavadas em metanol para dissolver o harmane. A solução foi filtrada a vácuo e a solução filtrada foi diluída então no metanol/tampão

Britton-Robinson (pH 11.0) 25/75%, v/v, quando o AgNO_3 foi usado, ou no metanol/água 25/75%, v/v quando foi empregado o TINO_3 .

As condições para a ECCM foram: capilar de sílica (50 cm de comprimento efetivo, 56 μM de diâmetro interno); potencial aplicado de 25kV; temperatura de 30°C; injeção feita a 50 mbar por 10 segundos. O tampão preparado para este método consistia numa mistura de 20 mmol.L^{-1} de tampão de borato (pH=9) contendo SDS (50 mmol.L^{-1}), uréia (0,6 mol.L^{-1}) e acetonitrila 15%, em volume. O pico de absorção do analito foi detectado em 254nm.

4. Resultados e Discussões

4.1. Determinação de harmol na presença de harmane e de harmine utilizando cloreto de mercúrio como solução de átomo pesado

Para este estudo foi escolhida a condição de pH original da solução da solução carreadora (metanol/água), na presença de Hg_2^{2+} 0,20 mol L^{-1} como íon de átomo pesado, por ser esta a melhor condição em que o harmol apresenta o maior sinal, quando comparado com o harmane e o harmine. A Figura 5 ilustra a situação acima.

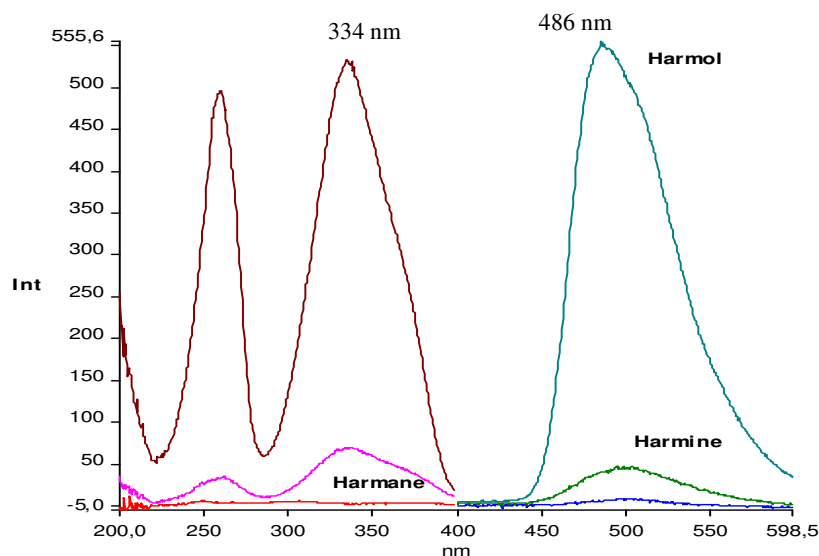


Figura 5: Espectros de excitação e emissão fosforescente do harmol, harmine e harmane (soluções $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e em pH natural), utilizando Hg_2^{2+} 0,20 mol L^{-1} como íon de átomo pesado.

Foi feito então um estudo da influência da concentração da solução de Hg_2^{2+} nos sinais fosforescentes dos analitos. O Gráfico 1: mostra que $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ é a concentração mais promissora para a determinação de harmol na presença de harmane e de harmine.

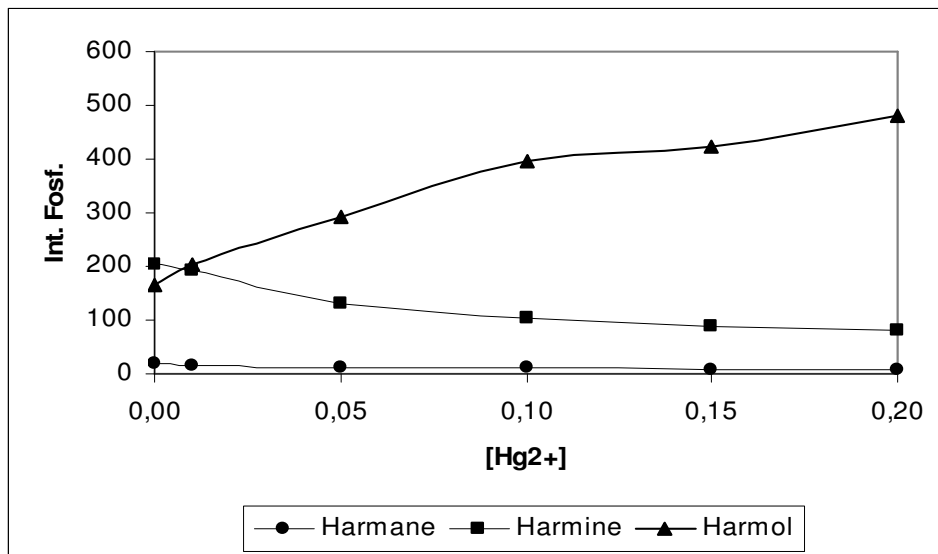


Gráfico 1: Influência da concentração da solução de Hg_2^{2+} no sinal fosforescente do harmol, harmane e harmine.

No entanto, como a linha referente ao harmol mostra uma tendência para o aumento de sinal fosforescente com o aumento da concentração de Hg_2^{2+} , também foi feito um estudo do efeito da pré-concentração de Hg_2^{2+} no sinal fosforescente destes analitos. Para isto, o volume de $5 \mu\text{L}$ a solução de Hg_2^{2+} $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ foi depositado de uma até cinco vezes no papel, previamente à adição da solução do analito, obtendo-se as seguintes massas de mercúrio depositadas: 0,20 mg, 0,40 mg, 0,60 mg, 0,80 mg e 1,00 mg. O Gráfico 2 mostra que a massa de 0,60 mg de mercúrio depositada no papel é a que produz um maior sinal para o harmol, enquanto que para o harmane e o harmine os sinais são bem reduzidos.

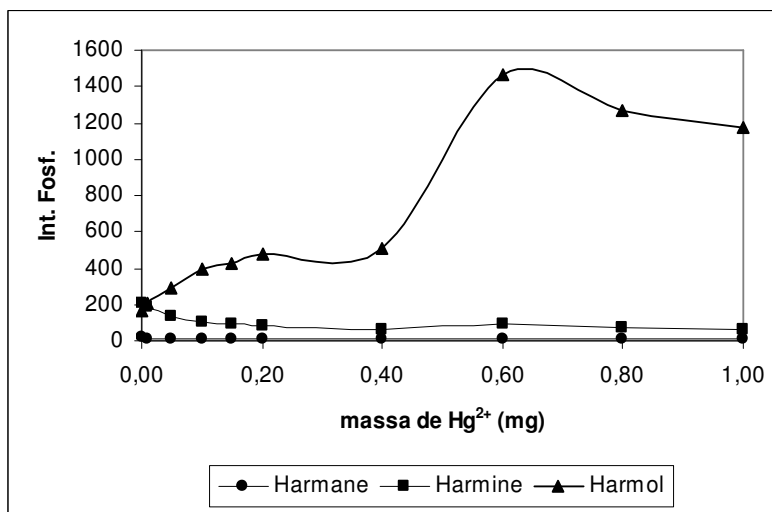


Gráfico 2: Efeito da pré-concentração do íon mercúrio no sinal fosforescente do harmol, harmane e harmine.

A partir de então, a fim de minimizar ainda mais o efeito dos sinais de harmane e do harmine no sinal do harmol, foi necessário fazer os espectros da 2ª derivada (Figura 6) das varreduras dos sinais fosforescentes do harmol, harmane e harmine em pH natural e utilizando a massa de 0,60 mg de mercúrio depositada no papel.

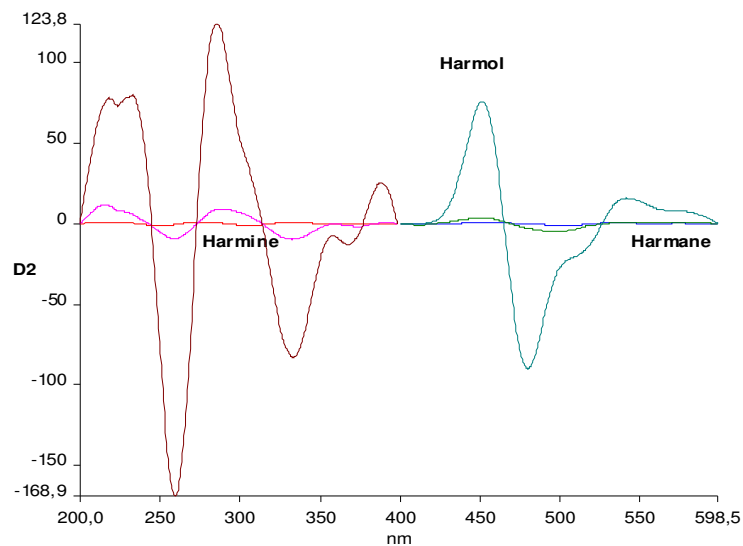


Figura 6: Espectros da 2ª derivada das varreduras dos sinais fosforescentes do harmol, harmane e harmine em pH natural e utilizando a massa de 0,60 mg de mercúrio depositada no papel.

Utilizando a situação acima, foram feitas varreduras em 2ª derivada das misturas mostradas na Tabela 1, em que os comprimentos de onda considerados foram: 539 nm para a determinação de harmol na presença de harmine, 430 nm para a determinação de harmol na presença de harmane e 564 nm para a determinação de harmol na presença de ambos (harmane e harmine).

Tabela 1: Determinação de harmol na presença de harmane e de harmine

pH natural / 0,60 mg Hg ₂ ²⁺	
Razão molar (harmol:harmine)	$I_{Exc (HARMOL+HARMINE)} / I_{Exc (HARMOL)}$
1:1	0,99 ± 0,10 (539 nm)
1:10	0,89 ± 0,12 (539 nm)
Razão molar (harmol:harmane)	$I_{Exc (HARMOL+HARMANE)} / I_{Exc (HARMOL)}$
1:1	1,21 ± 0,23 (430 nm)
1:10	0,97 ± 0,17 (430 nm)
Razão molar (harmol:harmine:harmane)	$I_{Exc (HARMOL+HARMINE+HARMANE)} / I_{Exc (HARMOL)}$
1:1	0,92 ± 0,10 (564 nm)
1:10	1,12 ± 0,16 (564 nm)

Com este experimento pôde-se concluir que pode ser possível, utilizando o artifício da 2ª derivada para aumento da seletividade, a determinação destes derivados da β-carbolina em amostras de fluido biológico, por exemplo.

4.2. Determinação de harmol na urina

Testes de recuperação em amostras de urina contendo diferentes quantidades de harmane, harmine e harmol foram realizados. A recuperação média de harmol, usando interpolação em curva analítica, foi de 92 ± 6%. Esse resultado indicou que o método tem uma boa aplicabilidade em termos de seletividade. Limites de detecção e quantificação absolutos foram estimados em 85 ng e 280 ng, respectivamente.

4.3. Determinação de harmane em comprimido simulado

O método de FTASS foi validado através da comparação deste método com a ECCM. Foi necessário formular no laboratório um comprimido contendo talidomina e harmane. Uma recuperação média de 104 ± 6% (n=6, três para cada sal pesado do átomo), foi conseguida, indicando a validade de tal aplicação. Estes mesmos comprimidos simulados foram analisadas pela eletrocromatografia capilar micelar (ECCM) a fim de comparar às

recuperações conseguidas na FTASS. Foi obtida a recuperação média de 96+6% (n=5). Um teste estatístico não indicou nenhuma diferença nos resultados conseguidos pelos dois métodos ($p=0.05$; $n_{FTASS}=6$; $n_{ECCM}=5$).

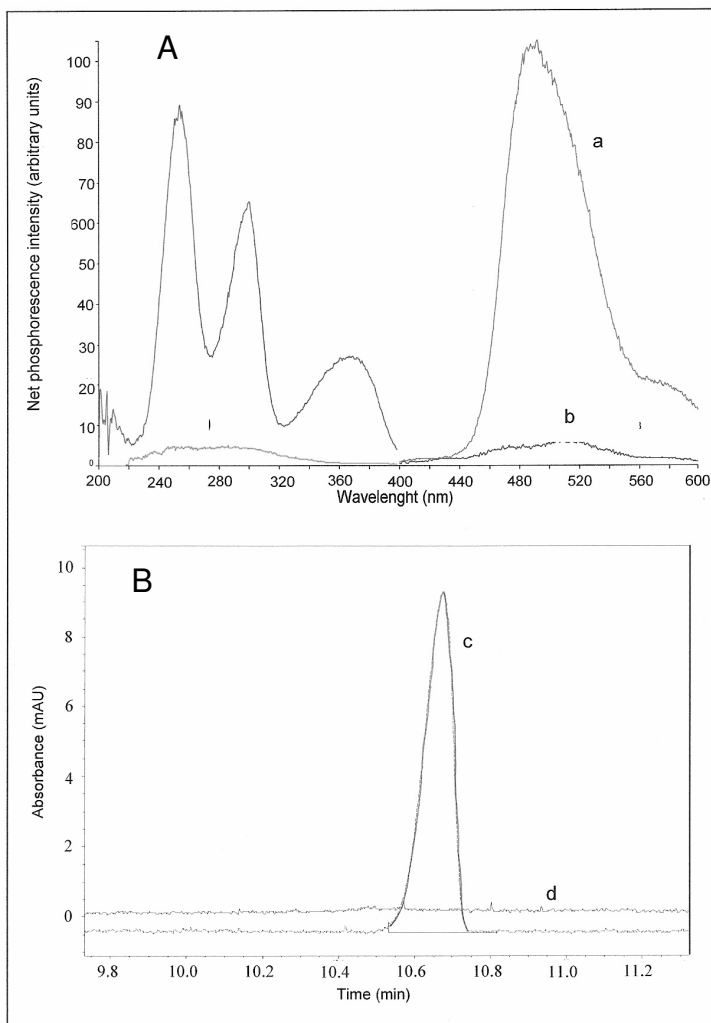


Figura 7: (A) $TlNO_3$ induced room-temperature phosphorescence spectrum for a mixture of harmane and thalidomide (a) and for thalidomide (b);(B) MECK electropherogram for a mixture of harmane and thalidomide (c) and for thalidomide(d).

5. Conclusões

Um método de determinação de harmane através da FTASS foi desenvolvido. Os melhores resultados foram aqueles induzidos com $AgNO_3$ e $TlNO_3$. As circunstâncias experimentais e instrumentais otimizadas permitiram uma excelente sensibilidade e uma escala linear dinâmica satisfatória. Os estudos da interferência foram feitos e os resultados experimentais indicaram uma potencialidade seletiva do método para diversas substâncias

concomitantes (dois alcalóides, talidomida e zidovudine). Uma formulação simulada do harmane, contendo a talidomida como uma droga concomitante, foi analisada pelo método FTASS e quando comparado com o ECCM demonstrou potencial para ser usado para tal aplicação analítica. O método baseado na FTASS se mostrou simples e seletivo, eliminando a necessidade do uso de métodos de separação (HPLC por exemplo²⁰) para isolar o analito de interesse nem de abordagens de calibração multivariada para determinação seletiva de beta-carbolinas.

6. Referências

- ¹ MEESTER, C. *Genotoxic potential of β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -carbolines*. Mutation Research, v. 376, p. 253-259, 1997.
- ¹⁰HERRAIZ, 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 Phosphormetry 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 fosforescence. *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 fosforescence 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-stabilies, and solution-sensitizes 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 www.rsc.org/pdf/capelectrosc.pdf. *Background theory and principles of capillary electrophoresis*.
- ³⁶ QUEIROZ, S. C. N. e JARDIM, I. C. S. F.. *Eletroforese capilar*: www.chemkeys.com, 2001.
- ³⁷ HARRIS, D. C.. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 5ª ed, 2001.