

1

Analitos de interesse clínico e biológico

1.1

Camptotecina, irinotecana e topotecana

Depois das doenças cardíacas, o câncer constitui a principal causa de morte no mundo. Com os métodos atuais de tratamento, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia e radioterapia e imunoterapia), que são bastante eficazes quando o tumor não está metastizado na ocasião do tratamento. Porém, muitas vezes se faz necessário o uso de quimioterapia, tratamento no qual uma série de drogas anticancerígenas é administrada ao paciente. O ideal seria que estas drogas anticancerígenas erradicassem as células cancerosas sem prejudicar os tecidos normais. Infelizmente, não há agentes disponíveis que satisfaçam esse critério, e o uso clínico dessas drogas exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na busca de um índice terapêutico favorável.

No tratamento do câncer, já foram desenvolvidas várias classes de drogas que incluem agentes indutores de diferenciação, destinados a forçar as células neoplásicas a formarem células de estágio final com pouca ou nenhuma potencialidade neoplásica; drogas antimetastáticas, destinadas a alterar as propriedades de superfície das células malignas, modificando assim a sua propriedade invasiva e metastásica; agentes específicos para células-tronco tumorais, destinados a explorar a maior capacidade das reações redutoras nestas células terapeuticamente resistentes, devido à deficiência de oxigênio nos tumores sólidos e drogas radiosensibilizantes tumorais e radioprotetoras dos tecidos normais, destinadas a aumentar a eficiência terapêutica da radioterapia.¹

A camptotecina (CPT) é um alcaloide anticancerígeno extraído das árvores *Camptotoca acuminata*² e *Mappia foetida*^{3,4}, encontradas na China e na Índia. Sua estrutura química (Figura 1a) foi determinada por difração de raios-X.⁵ Além de ser uma substância muito tóxica⁶, a administração intravenosa deste fármaco é limitada devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas que apresentam baixos valores de pH. A inativação de suas propriedades anticancerígenas é decorrente da abertura do anel lactônico, em pH fisiológico.⁷ Por isso, estudos

clínicos para esta substância foram abandonados de 1970 a 1980. No final dos anos 1980, CPT começou novamente a ser de grande interesse por causa da identificação da enzima topoisomerase I do DNA como sendo um alvo celular para esta classe de drogas.⁸ Assim, vários derivados do CPT foram sintetizados e usados com sucesso no tratamento de vários tipos de câncer, sendo a irinotecana (CPT-11) (Figura 1b) e a topotecana (TPT) (Figura 1c) os mais importantes e que, inclusive, já possuem a aprovação do FDA (*United States Food and Drug Administration*) para tratamento clínico. O Hycamtin® (TPT), lançado pela SmithKline Beecham em jun/1996, está aprovado para terapias de câncer no ovário, e o Camptosar® (irinotecan HCl) da Pharmacia & Upjohn, para câncer de cólon e reto⁹. Suas vendas representam 1/3 de todo o mercado farmacêutico de drogas quimioterápicas. Independentemente do lucro que trouxeram às suas empresas, as duas substâncias foram responsáveis pelo salvamento de centenas de milhares de vidas em todo o mundo.⁵

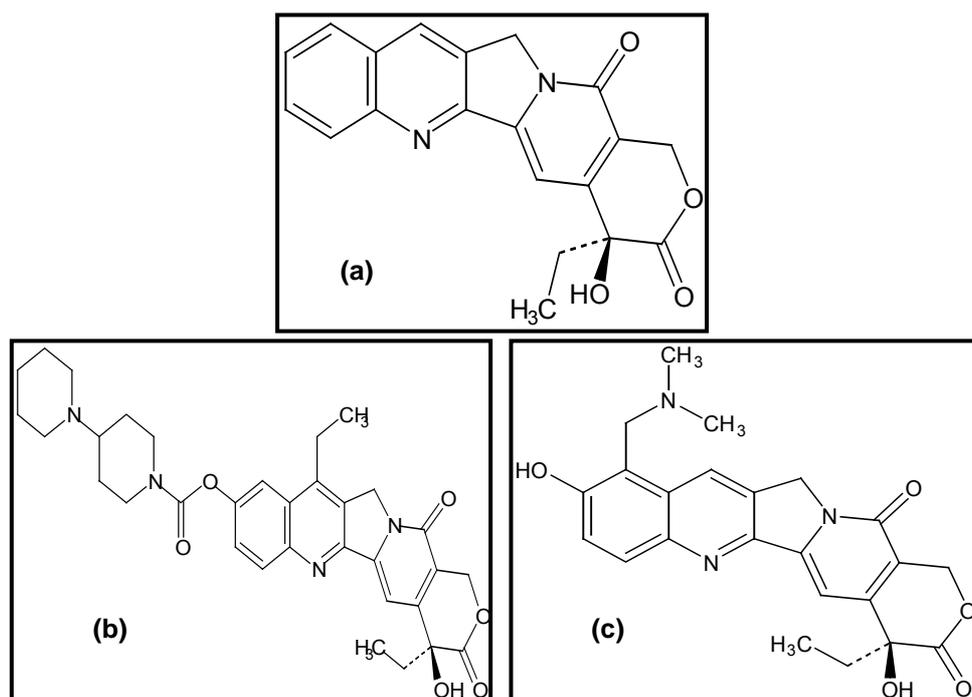


Figura 1: Estruturas da (a) camptotecina, (b) irinotecana e (c) topotecana

A hidrólise do anel lactônico do CPT e de seus derivados produz um hidróxi-ácido e estas duas espécies ficam em equilíbrio em tampões aquosos (Figura 2).^{10,11} No entanto, a forma aberta (hidróxi-ácido) é um inibidor menos potente da topoisomerase I e, conseqüentemente um agente antitumoral menos

eficaz. Assim, o anel lactônico fechado possui uma atividade muito mais importante no combate ao tumor.⁴

O percentual das formas carboxilada ou lactônica presentes no equilíbrio e a taxa de conversão entre estas duas espécies depende do pH do meio. Em condições ácidas ($\text{pH} < 5$) a estrutura lactônica é predominante, enquanto que em valores de $\text{pH} > 8$, a forma do anel aberto (carboxilado) é predominante. Em pH fisiológico ($\text{pH} 7,4$), o equilíbrio se processa em favor da conversão para a forma de carboxilato para todos dos derivados da CPT, exceto para o SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), o principal metabólito do CPT-11. Por isso, é de grande interesse o estudo de ambas as formas (lactona e carboxilada) nas aplicações clínicas.⁸

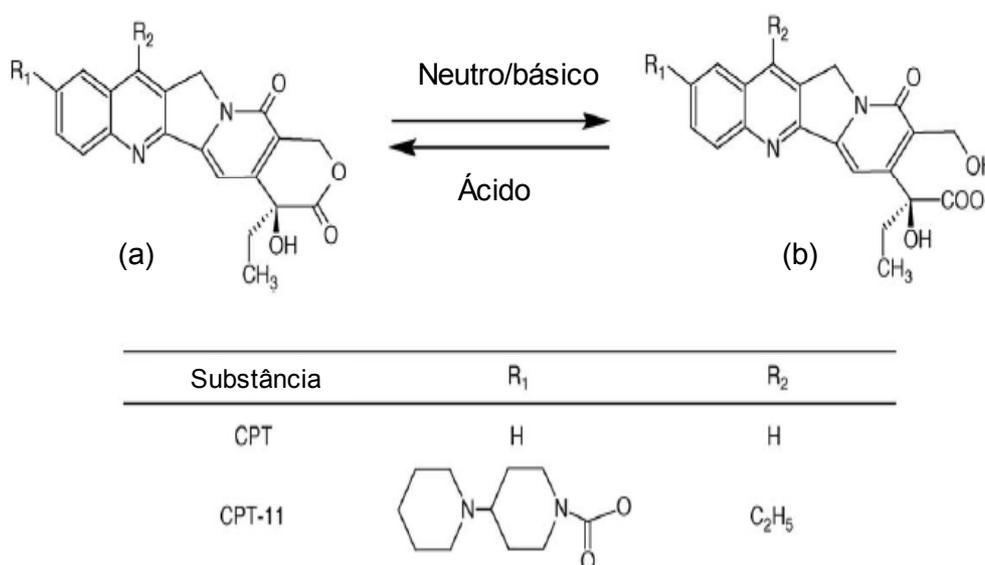


Figura 2: Representação esquemática da hidrólise reversível do (a) anel lactônico para a forma do (b) anel aberto carboxilado da camptotecina e seu derivado CPT-11.

O mecanismo de ação da camptotecina envolve a inibição da topoisomerase I, resultando na formação de um complexo ternário entre a CPT, topo I e o DNA¹² (Figura 3). A topoisomerase I é uma enzima presente em altas concentrações nos tumores e que torcem e destorcem o DNA (chave de instruções para a reprodução) que compõe os cromossomos, os quais devem ser destorcidos para que a célula possa usar a informação genética para sintetizar proteínas. A camptotecina faz com que os cromossomos fiquem

enroscados firmemente, impedindo a célula de fazer proteínas. Como resultado, a célula para de crescer. Como as células cancerosas crescem e se reproduzem muito mais rápido que as células normais, elas são mais vulneráveis à inibição da topoisomerase que as células normais.⁷

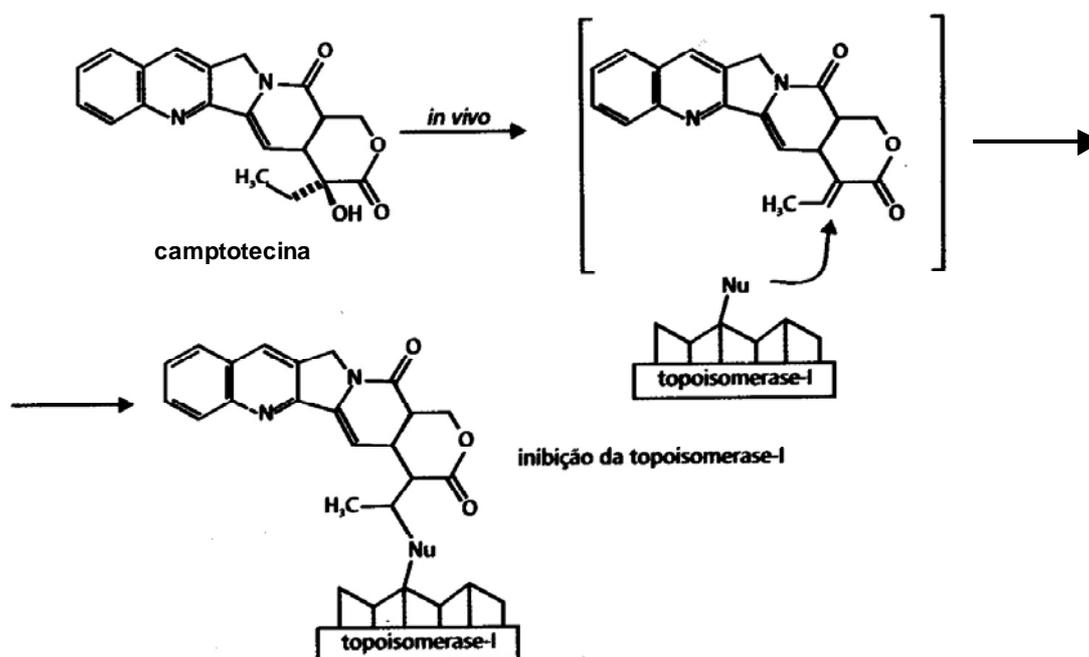


Figura 3: Mecanismo de ação da camptotecina

1.1.1

Métodos para a determinação de CPT e seus derivados

Na produção de um medicamento, o fármaco de interesse estará em conjunto com vários outros ingredientes que farão parte da matriz de análise e que devem ser considerados no procedimento analítico. Além disso, sabendo-se que o uso de uma droga quase sempre envolve a transferência do fármaco para a corrente sanguínea, a sua quantificação tanto no medicamento quanto nos fluidos biológicos deve ser rigorosa, visto que uma concentração não ideal pode produzir efeitos indesejáveis, não curar e até causar a morte¹³. Assim, é de grande interesse desenvolver métodos analíticos seletivos, sensíveis e simples, levando em conta as características particulares de cada fármaco e considerando a complexidade das matrizes biológicas e farmacológicas.

Outra questão importante é o problema de falsificação de drogas medicinais, que foi reconhecido como um problema para a saúde e para o comércio internacional em uma conferência da Organização Mundial de Saúde

(OMS) em 1985. Desde então, tem crescido bastante a atenção para este assunto.¹⁴ Existe uma grande variedade de tipos de falsificações medicinais, as quais podem ser divididas em seis categorias: (i) produtos sem os ingredientes ativos; (ii) produtos com quantidades incorretas dos ingredientes ativos; (iii) produtos com ingredientes errados; (iv) produtos com quantidades corretas dos ingredientes ativos mas com fraude na embalagem; (v) cópias de um produto original e (vi) produtos com altos níveis de impureza e contaminação.¹⁵ Medicamentos a base de irinotecana e topotecana podem ter a camptotecina, por exemplo, como um potencial contaminante, ou mesmo o CPT pode ser utilizado para adulterar as formulações oficiais. Nessa questão, a química analítica (com novos métodos analíticos e capacitação de pessoal) tem um papel fundamental.

Vários fatores podem limitar o correto monitoramento terapêutico da droga (TDM) para agentes quimioterápicos, como, por exemplo, o efeito da concentração que não é muito definido para muitos agentes antineoplásicos como as camptotecinas. Claramente o TDM tem potencial para melhorar o uso clínico de agentes antineoplásicos, muitos dos quais têm índices terapêuticos estreitos e grande variação farmacocinética.

Até a década de 1980, o uso rotineiro de monitoramento de drogas terapêuticas em drogas antineoplásicas foi limitado ao metotrexato. Durante os últimos anos, no entanto, esta rotina de monitoramento na oncologia tem sido aplicada a outras drogas. No entanto, há limitações. Existe um entendimento incompleto da farmacologia e da cinética do fármaco na maioria dos agentes antineoplásicos; a concentração da droga no plasma é uma medida indireta da quantidade de fármaco no tecido alvo e há normalmente um longo tempo entre a medição da droga no plasma e a avaliação do efeito farmacodinâmico final. Definir relações concentração-efeito é ainda mais complicado pelo fato de que os cânceres são quase sempre tratados com múltiplas combinações de drogas. Esta combinação de medicamentos durante a quimioterapia não só complica a avaliação dos efeitos terapêuticos, mas também muitas vezes dificulta a farmacodinâmica da toxicidade das drogas. Assim, é difícil estabelecer intervalos e quais são os elementos essenciais para TDM. Além disso, características celulares contribuem para a variabilidade da resposta do consumo de droga entre os pacientes e limitam a precisão das “faixas terapêuticas” para agentes anticancerígenos.⁴

A quimioterapia com CPT e seus derivados poderia ser melhorada através da aplicação de TDM, porque, como outros medicamentos anticancerígenos, as

camptotecinas têm alta variável farmacocinética e índices terapêuticos estreitos. A máxima eficácia da quimioterapia é de primordial importância devido às enormes consequências para pacientes com câncer. O conhecimento sobre a faixa terapêutica das camptotecinas é de grande utilidade clínica, a fim de maximizar a eficácia e minimizar efeitos adversos indesejáveis. Embora o objetivo final do TDM seja a de individualizar a quimioterapia, outros potenciais benefícios incluem a minimização da variação da farmacocinética entre os pacientes, o ajuste da dose em doentes com disfunções hepáticas e/ ou renais e detecção de interações medicamentosas.

Uma boa execução de TDM inclui a correta administração da droga, tratamento adequado de amostras de sangue, precisão na medição das drogas e metabólitos e interpretação adequada dos resultados. Uma quantificação exata e precisa das drogas e metabólitos é crítica na TDM. Graças à tecnologia avançada, a quantificação e o monitoramento de muitas drogas ou metabólitos é automatizado com reagentes disponíveis comercialmente. No entanto, este não é o caso de medicamentos anticancerígenos, a maioria dos quais deve ser medido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa. Para a determinação dos níveis de CPT em plasma humano, a maioria dos ensaios desenvolvidos até a data é baseada em HPLC. É essencial utilizar métodos analíticos bem caracterizados e plenamente validados para quantificar e monitorar as drogas e/ ou metabólitos. Preferencialmente, os ensaios selecionados devem ser exatos, precisos, simples, rápidos e sensíveis, e com o mínimo de interferências. O método deve ser clinicamente e financeiramente viável se é para ser executado em uma rotina.⁴

Em geral, os estudos de separação e de quantificação do CPT e de seus derivados foram feitos por HPLC com detecção por fluorescência. Os métodos por HPLC descritos para estas determinações estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Métodos por HPLC para a camptotecina e seus derivados

Substância	Espécime	Coluna	Deteção	Pré-tratamento da amostra	Ref.
CPT	ratos, plasma, coração, fígado, baço, pulmão, rins, cérebro	RP-C ₁₈	Flu, Ex 360 nm, Em 430 nm	SPE	16
CPT	bílis de rato	Micro RP-C ₁₈	Flu, Ex 360 nm, Em 440 nm	Microdiálise	17
CPT	sangue de rato, cérebro	RP-C ₁₈	Flu, Ex 360 nm, Em 440 nm	Microdiálise	18
CPT	Plasma e urina de rato	RP-C ₁₈	Flu, Ex 370 nm, Em 434 nm	LLE	19
CPT	Plasma de rato	RP-C ₁₈	Flu, Ex 369 nm, Em 426 nm	Precipitação de proteína	20
CPT	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 360 nm, Em 440 nm	SPE	21
CPT-11	Soro humano	RP-C ₁₈	LC-ES-MS	Precipitação de proteína	22
CPT-11	Soro de rato	RP-C ₁₈	Flu, Ex 373 nm, Em 428 nm	SPE	23
CPT-11	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 362 nm, Em 425 nm	Precipitação de proteína	24
CPT-11	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 370 nm, Em 432 nm	SPE	25
CPT-11	Plasma, urina e fezes humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 228 nm, Em 450 nm	Precipitação de proteína	26
CPT-11	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 355 nm, Em 515 nm	Precipitação de proteína	27
CPT-11	Plasma e urina humano	RP-C ₁₈	LC-APCI-MS	LLE	28
CPT-11	Plasma humano	TSK ODS-80Ts	Flu, Ex 380 nm, Em 556 nm	Precipitação de proteína	29
CPT-11	Plasma de rato	Hypersil C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 540 nm	Precipitação de proteína	11
CPT-11	Células de rato	ODS-C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 540 nm	Precipitação	30
CPT-11	Fígado e plasma humano	Alltima C ₁₈	LC-MS/MS	Precipitação de proteína	31

Continuação da Tabela 1

Composto	Espécime	Coluna	Detecção	Pré-tratamento da amostra	Ref.
SN-38	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 375 nm, Em 560 nm	Precipitação de proteína	24
SN-38	Plasma humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 532 nm	SPE	25
SN-38	Plasma, urina e fezes humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 228 nm, Em 543 nm	Precipitação de proteína	26
SN-38	Plasma humano	TSK ODS-80Ts	Flu, Ex 380 nm, Em 556 nm	Precipitação de proteína	29
SN-38	Plasma de cão	Zorbax SB-C ₁₈	Flu, Ex 368 nm, Em 515 nm	Precipitação de proteína	32
SN-38	Plasma de rato	Hypersil C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 540 nm	Precipitação de proteína	11
SN-38	Células de rato	ODS-C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 540 nm	Precipitação	30
SN-38	Fígado e plasma humano	Alltima C ₁₈	LC-MS/MS	Precipitação de proteína	31
TPT	Plasma, urina e fezes humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 527 nm	LLE	33
TPT	Plasma e urina humano	RP-C ₁₈	Flu, Ex 381 nm, Em 525 nm	LLE	34
TPT	Plasma humano	Zorbax SB-C ₁₈	Flu, Ex 361 nm, Em 527 nm	Precipitação de proteína	35
TPT	Sangue humano	ODS 80A	Flu, Ex 381 nm, Em 525 nm	Precipitação de proteína	36
TPT	Plasma humano	Agilent SB-C ₁₈	Flu, Ex 376 nm, Em 530 nm	Precipitação de proteína	37
TPT	Plasma de rato	Nova Pack C ₁₈	Flu, Ex 361 nm, Em 527 nm	Precipitação de proteína	38
TPT	Plasma humano	Nova Pack C ₁₈	Flu, Ex 380 nm, Em 527 nm	Precipitação de proteína	39

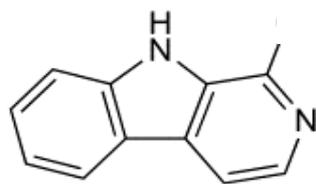
1.2

Derivados da β -carbolina

Nos países em desenvolvimento, uma boa parte da população ainda usa a medicina tradicional para satisfazer as suas necessidades de saúde, e neste contexto as plantas medicinais ainda constituem um material básico para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novas drogas.

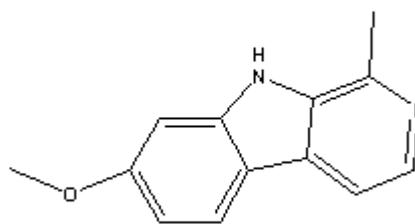
Harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane são alcaloides que pertencem à família das β -carbolinas. Suas estruturas químicas (Figura 4) estão relacionadas com as estruturas das aminas aromáticas heterocíclicas, que são identificadas como produtos da pirólise de aminoácidos e proteínas contidas em carne ou peixe cozidos, por exemplo. O harmane, especificamente, é um dos principais produtos obtidos da pirólise do D,L-triptofano.⁴⁰ Além disso, o harmane também é um dos produtos da oxidação de uma outra β -carbolina, o 1-metil-tetrahydro- β -carbolina, a qual é formada no organismo após a ingestão de álcool, sendo maior a sua concentração durante o período de ressaca.⁴¹ O harmane e o norharmane também são constituintes normais do corpo e são produzidos *in vivo* pela ciclização de alquilaminas-indólicas com aldeídos (vide exemplo do harmane na Figura 5) ocorrendo na maioria dos tecidos animais e humanos.⁴²

O harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e o norharmane estão presentes em várias plantas medicinais, tais como a *Grewia bicolor*, a *Tribulus terrestris*, a *Passiflora incarnata* e principalmente a *Peganum harmala* L.^{43,44}, a qual contém cerca de 55,5 mg de harmine por grama de extrato seco da planta. 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.⁴⁵



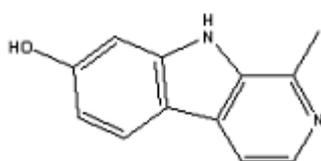
Harmane

(a)



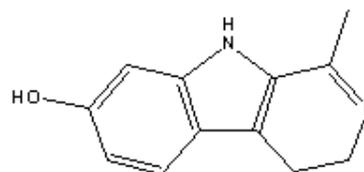
Harmine

(b)



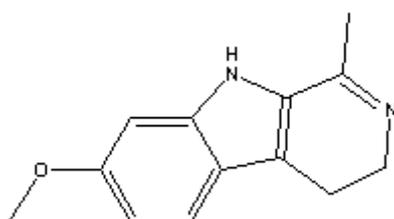
Harmol

(c)



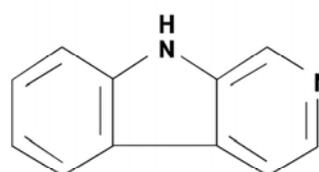
Harmalol

(d)



Harmaline

(e)



Norharmane

(f)

Figura 4: Estruturas dos derivados da β -carbolina: harmane (a); harmine (b); harmol (c); harmalol (d); harmaline (e); norharmane (f)

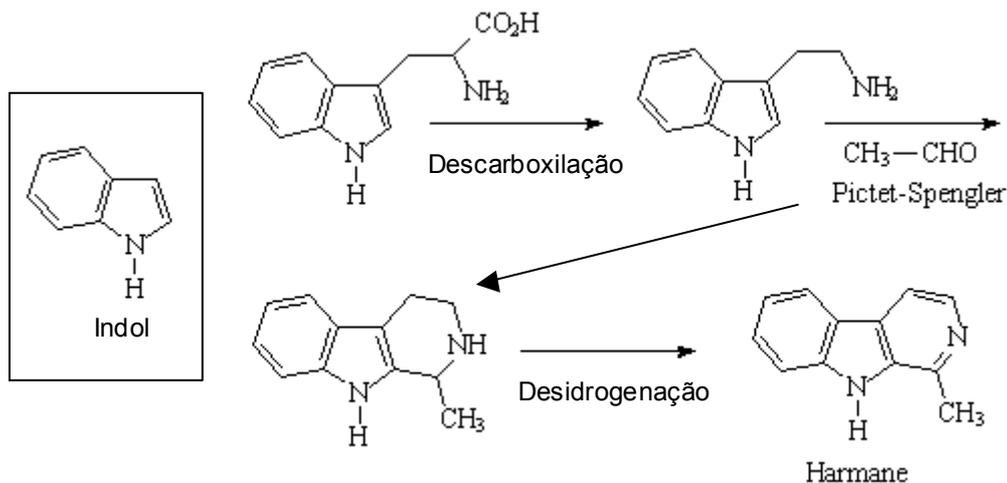


Figura 5: Biossíntese do harmane

O harmane tem ação direta no sistema nervoso central, sendo classificado no grupo de drogas ditas alucinógenas. É encontrado no tabaco, em alimentos grelhados, bebidas (vinho, uísque, cerveja) e em alguns grãos como o arroz e o milho^{46,47}. O harmane tem várias atividades biológicas, agindo como antimicrobiano, antioxidante, antimalárico e, potencialmente, como anti-HIV^{48,48,49} e no tratamento da epilepsia⁵⁰.

Devido à presença destas substâncias 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 $42 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e em cigarros (mais de $14,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de tabaco), eles são considerados como contaminantes comuns da dieta diária das pessoas.^{40,47,51} 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.⁴⁰ Embora pouco se saiba sobre o mecanismo de transporte destas β -carbólinas ao longo da membrana celular, o seu nível de fototoxicidade tem uma relação direta com a permeabilidade da droga na membrana.⁵²

Poindexter Jr. e Carpenter (1962)⁵³ isolaram o harmane e o norharmane do tabaco e de sua fumaça. Estudos quantitativos mostraram que na fumaça do cigarro existem, em média, $15 \text{ } \mu\text{g}$ de harmane por grama de cigarro fumado. Como o tabaco por si só contém somente cerca de 1% deste total de harmane

encontrado na fumaça, a formação do harmane por pirólise do triptofano foi sugerida.

Também foi demonstrado que o harmane e o harmine podem interagir, direta ou indiretamente, com o DNA de bactérias e de células de mamíferos, inibindo enzimas do DNA e impedindo a sua replicação, além de formar novas espécies mutagênicas e até mesmo reparar os defeitos do DNA.^{54,55}

O harmane também é responsável por uma doença denominada Tremor Essencial (*Essential tremor*), que é 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 alcaloide de forma diferente ou simplesmente produzem maior quantidade deste.^{56,57,58}

O estudo de suas propriedades anticancerígenas mostrou que a presença de harmane na dieta de macacos provocou alterações das células malignas, principalmente no fígado e no rim⁴⁰. Um outro estudo, também em macacos, mostrou que o harmine teve um efeito moderado contra um tipo de câncer no pulmão.⁴⁸

Conforme já foi mencionado, o harmine constitui um dos principais metabólitos do harmane. Cerca de 13% do harmane administrado oralmente por ratos, é transformado em harmine (determinação 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. Baseando-se neste e em outros estudos, uma rota metabólica destas substâncias é mostrada na Figura 6. O harmane, uma vez absorvido pelo corpo, sofre um primeiro passo do metabolismo pelo citocromo P-450 no fígado, produzindo o metabólito 7-hidroxi, 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-hidroxi-harmane aumenta a lipofilicidade, o harmine pode ser mais favoravelmente distribuído pelos tecidos do corpo.⁵⁹

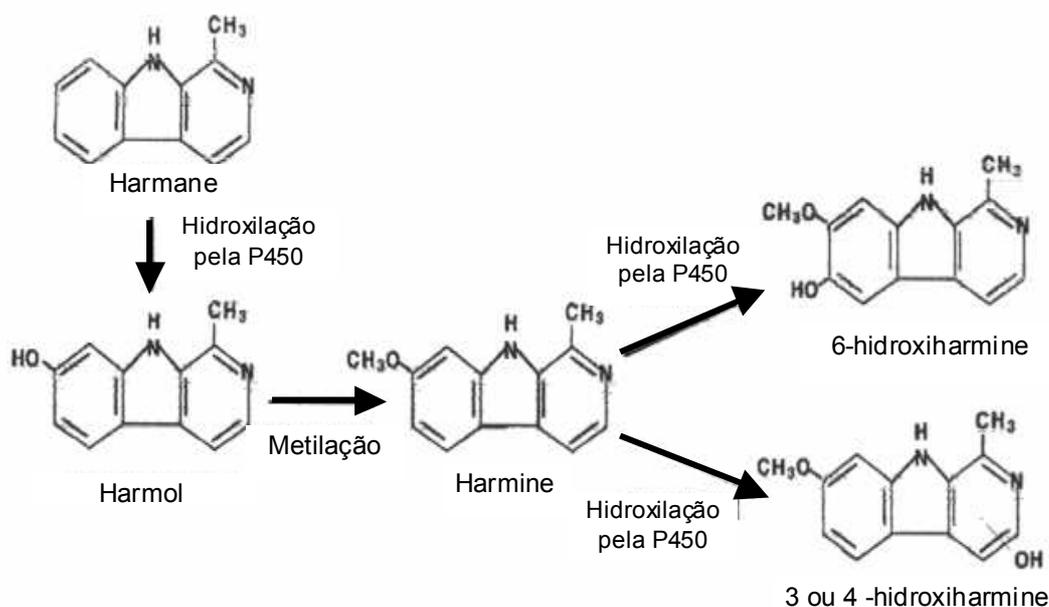


Figura 6: Rota metabólica proposta para o harmane e o harmine

Com o objetivo de ajudar nas pesquisas relacionadas à atividade antiHIV do harmane, Kusurkar e Goswami⁶⁰ mostraram um método para síntese de harmane e seus derivados através de uma reação de heterociclização do monoazahexatrieno.

Kartal *et al*⁶¹, estudaram o efeito do harmane e do harmine em ratos com síndrome de abstinência de morfina. Os autores verificaram que o harmane apresentou resultados positivos, atenuando inclusive, os sintomas de tremedeira nas pernas e nos dentes. Como as doses de harmane e harmine utilizadas em ratos não dependentes de morfina não produziram nenhum efeito significativo em suas atividades motoras, os efeitos benéficos destes agentes nos sinais de síndrome de abstinência de morfina não estão relacionados com outros efeitos farmacológicos destas drogas tais como sedação, excitação ou relaxamento muscular.

A doença de Chagas é um sério problema de saúde em países Latino Americanos, onde mais de 20 milhões de pessoas já foram infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, um parasita protozoário que causa esta doença. Os índices de mortalidade chegam a 8-12%, dependendo da idade e do estado fisiológico do paciente. Nifurtimox e benzinidazole, as drogas mais utilizadas para este tratamento, têm mostrado muitos efeitos colaterais em 40 - 70% dos pacientes, obrigando-os a parar com o tratamento. Além disso, nifurtimox não tem sido mais

usado em diversos países por causa de sua toxicidade e ineficácia em alguns estágios da doença de Chagas. Por isso, várias substâncias químicas naturais e sintéticas têm sido estudadas. Entre estas substâncias, estão os alcaloides β -carbolinas, que se mostraram ativos contra as espécies *Trypanosoma (in vitro)*, o que pode ser devido principalmente a interações com o metabolismo do DNA destes parasitas por causa da estrutura planar destas moléculas.⁶²

1.2.1

Métodos para determinação de β -carbolinas

Cheng e Mitchelson (1997)⁶³ estudaram a separação de uma mistura de seis derivados da β -carbolina (harmane, norharmane, harmine, harmaline, harmol e harmalol) usando cromatografia eletrocínética micelar com detecção por absorção UV, com completa resolução dos picos em 14 min de corrida.

Zheng *et al* (2000)⁶⁴ desenvolveram um método analítico para determinar níveis de harmane e harmine no sangue. Para tal, sangue humano foi extraído com acetato de etila e éter metil-t-butílico (2:98, v/v) em meio alcalino. Após evaporação do solvente orgânico, as amostras foram reconstituídas em metanol e em seguida fracionadas em uma coluna C-18 com fase móvel isocrática consistindo de tampão de fosfato de potássio (pH 6,5) e metanol (30:70 v/v). A detecção foi feita por medição de fluorescência. O método alcançou limites de detecção de 206 e 81 pg mL^{-1} de harmane e harmine, respectivamente, em 10 mL de sangue humano. A precisão (CV) do método foi de 6,7% e 3,4%, para o harmane e o harmine, respectivamente. Apesar do método se mostrar reprodutível e útil para estudos de toxicidade das β -carbolinas, o tempo gasto na extração feita na coluna C-18 é inconveniente.

Com o objetivo de determinar níveis farmacológicos de harmane e harmine em tecidos do cérebro, no fluido da espinha e em plasma sanguíneo, Moncrieff (1989)⁶⁵ usou cromatografia líquida (HPLC) de fase reversa seguida de detecção por fluorimetria. O autor concluiu que níveis mais altos das substâncias podem ser encontrados preferencialmente em uma área específica do cérebro, o que pode ser devido não só a fontes externas, mas também a uma produção endógena.

β -carbolinas presentes em plaquetas humanas foram extraídas com éter dietílico e depois identificadas por fluorimetria, cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (MS). Neste estudo feito por Bidder *et al* (1979)⁶⁶, o harmane foi a única substância do grupo das β -carbolinas inequivocamente

identificado em amostras de plaquetas com estas técnicas. E já que o harmane é também biossintetizado pela condensação da triptamina e do acetaldeído, sua formação pode ser de grande importância no metabolismo e nas ações farmacológicas e tóxicas do álcool.

Kartal, Altun e Kurucu (2003)⁴⁵ também utilizaram a cromatografia líquida e a espectrofotometria para a separação e a determinação de algumas β -carbolinas, entre elas o harmine, em sementes da *Peganum harmala* L. A separação foi feita usando uma coluna (Metasil ODS) de eluição isocrática com álcool isopropílico:acetonitrila:água:ácido fórmico (100:100:300:0,3 v/v/v/v) e o pH foi ajustado a 8,6 com trietilamina. Detecção espectrofotométrica foi realizada em 330 nm.

Outra abordagem, baseada na adição contínua de reagente, também foi utilizada para a determinação de alcaloides alucinógenos, tais como o harmane e o harmine, através da medição da quimioluminescência produzida na reação com o sistema bis(2,4-dinitrofenil)oxalato e peróxido de hidrogênio. Os dados cinéticos (intensidade relativa da quimioluminescência versus tempo) e o sinal quimioluminescente foram monitorados do início ao fim da reação. Para mostrar a aplicabilidade da técnica, os autores (Cepas *et al*, 1995) determinaram estas substâncias em amostras de plasma e os resultados foram satisfatórios e seletivos, segundo os autores.⁶⁷

Martin *et al* (2003)⁶⁸ utilizaram a cromatografia eletrocínica micelar como um método alternativo para separar e determinar derivados da β -carbolina. Eles mostraram a existência de complexos entre ciclodextrinas (CD), no caso β -ciclodextrinas, a hidroxipropil- β -ciclodextrina e o harmane e o harmine. A existência destes complexos foi mostrada por mudanças produzidas por espectros NMR, IR e UV-vis. Os autores concluíram que as ciclodextrinas possuem um papel importante nas técnicas de separação para discriminação destes alcaloides. A diferenciação é baseada em interações entre as moléculas hóspedes (β -carbolinas) e as hospedeiras (CD). Apesar das técnicas de NMR terem sido melhores para o estudo de interações entre as moléculas hóspedes e as hospedeiras, outras técnicas espectroscópicas possibilitaram o exame das interações.

Norharmane, harmane e harmine diferem-se em um grupo metil posicionado no C-1 e em um grupo metóxi no C-7 no anel da β -carbolina. Por isso, León *et al* (2008)⁶⁹ consideraram estas estruturas como ótimas para o estudo da influência da CD na separação destes alcaloides por HPLC. A

presença de CD na fase móvel altera o equilíbrio cromatográfico e induz um equilíbrio químico secundário associado à separação por HPLC. Duas fases estacionárias foram utilizadas (metil e octadecil) com soluções aquosas de metanol e etanol tamponadas como fases móveis. As concentrações de *o*-metil- β -ciclodextrina (DM β -CD) e 2,3,6-tri-*o*-metil- β -ciclodextrina (TM β -CD) variaram de 0 a $1,7 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. O aumento da concentração de CDs na fase móvel reduziu o tempo de retenção e as mudanças observadas nos fatores de retenção permitem a determinação de constantes de associação aparentes de alcaloide/CD, cuja magnitude é influenciada não só pelas propriedades químicas e estruturais das moléculas hóspedes, mas também pela composição da fase móvel.

Bahram Hemmateenejad *et al.* (2006)⁷⁰ usaram a técnica de PLS (mínimos quadrados parciais) para a determinação espectrofotométrica simultânea de harmine, harmane, harmalol e harmaline em sementes de *Peganum harmala* L, mostrando que as quantidades destas β -carbolinas nas sementes foram de 1,84%, 0,16%, 3,90% e 0,25%, respectivamente.

Lourdes Agüí *et al.* (2007)⁷¹, desenvolveram um método para a separação e quantificação de β -carbolinas em alimentos e bebidas por HPLC com detecção eletroquímica com eletrodos feitos com nanotubos de carbono. O método foi aplicado na análise de amostras de cerveja, café e queijos, nos quais foram feitas fortificações com β -carbolinas em níveis de concentração correspondentes aos que podem ser encontrados nas respectivas amostras.

Marques *et al.* desenvolveram um método analítico baseado na Fosforimetria na Temperatura Ambiente usando Substrato Sólido (SSRTP) para a determinação de harmane na temperatura ambiente, avaliando o seu potencial uso analítico. O papel de filtro ou cromatográfico foi utilizado para indução de fosforescência conjuntamente com o uso do efeito externo de íons de átomos pesados (AgNO₃ e TINO₃), permitindo limites de detecção de 0,12 e 2,4 ng quando do uso de AgNO₃ e TINO₃, respectivamente como indutores de fosforescência. Faixas de resposta linear se estendendo até 456 ng (AgNO₃) e até 911 ng (TINO₃) foram obtidas. Desvios padrões relativos de cerca de 3% foram observados em substratos contendo 46 ng de harmane e taxas de recuperação em torno de 100% foram obtidas para determinações em medicamento simulado e em urina enriquecida. Maiores detalhes deste trabalho podem ser visto no artigo publicado, conforme referência ⁷². Estudos similares de SSRTP com harmine também foram feitos por Marques *et al.*⁷³

Marques *et al.* (1999)⁷⁴ usaram micelas neutras, aniônicas e catiônicas como uma imitação da membrana biológica. A técnica espectrométrica de luminescência resolvida no tempo em matrizes a 77 K e métodos de cálculos de orbitais moleculares (PM3-MOPAC/93 e HAM/3-CI) foram utilizados para otimização geométrica e cálculos das energias de excitação, foram utilizados. Os surfactantes utilizados foram o Triton X-100 (neutro), o dodecil sulfato de lítio (aniônico), e o brometo de hexadecil-trimetilamônio (catiônico). Em meio micelar (neutro, aniônico e catiônico), o harmame desprotonado penetra no interior da micela permanecendo na região aquosa. Estes estudos mostraram que uma estrutura micelar bem definida é mantida em 77 K e os resultados obtidos foram usados como meios diretos para caracterização de quais espécies são solúveis no interior da micela e quais realmente permanecem e agem na região na célula. As observações deste trabalho foram úteis para o entendimento do transporte das drogas através da membrana e em especial, da ação farmacológica do harmame em nível molecular.

Olba *et al.* (1987)⁷⁵ investigaram a fosforescência por polarização e por tempo de vida do harmame em éter etílico-isopentano-etanol (5:5:2 v/v) e em metil-ciclohexano (MC) a 77 K, com o objetivo de caracterizar o estado tripleto responsável pela fosforescência, assim como elucidar qualitativamente a importância dos efeitos de acoplamento de spin em relação aos mecanismos do processo de fosforescência.