

3

Materiais, reagentes, soluções, instrumentação e métodos

3.1

Materiais e reagentes

A água deionizada (18,2 MΩcm) utilizada para o preparo de todas as soluções aquosas foi obtida de um ultrapurificador de água Milli-Q gradient A10 - Millipore (Massachusetts, EUA).

Os derivados da β-carbolina, harmane 98% e harmine 98%, harmol 98% harmalol 98%, harmaline 90% e norharmane 98% foram adquiridos da Acros Organics (Nova Jersey, EUA). O padrão da camptotecina (CPT) e o da irinotecana (CPT-11) foi da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Pelo fato de, até o momento, não haver comercialização do padrão de topotecana (TPT), este foi obtido do medicamento injetável Hycamtin (um pó liofilizado e estéril contendo hidrocloreto de topotecana equivalente a 4 mg of topotecana da Glaxo SmithKline). Uma solução injetável do medicamento Camptosar (Pfizer) contendo 20 mg mL⁻¹ cloridrato de irinotecana foi escolhida como amostra de formulação farmacêutica de CPT-11. Nos estudos de incerteza o padrão de crisenone 98% foi obtido da Acros Organics.

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.

Nos estudos de fluorescência, os sais inorgânicos utilizados no preparo das soluções de átomos pesados foram de várias procedências: nitrato de tálio (I) e acetato de cádmio dihidratado da Acros Organics; nitrato de prata, nitrato de chumbo (II) e cloreto de mercúrio (II) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e iodeto de potássio da Merck (Darmstadt, Alemanha). O sulfato de sódio obtido também da Merck foi utilizado somente nos testes feitos para verificar se os analitos emitiam sinal fosforescente diretamente em solução.

O surfactante utilizado como modificador de superfície na SSRTF e também como integrante da solução tampão em MEKC foi o dodecil sulfato de sódio 99% proveniente da Merck. Além da água ultrapurificada, os solventes

usados foram metanol, etanol e acetonitrila, todos grau HPLC da Merck. Quando era necessário tornar o meio ácido ou básico, utilizou-se ácido clorídrico P.A. e hidróxido de sódio P.A., ambos da Merck.

Na construção das curvas de influência do pH utilizou-se o tampão Britton-Robinson¹⁰⁹ (0,04 mol L⁻¹), em cujo preparo utilizou-se ácido orto-fosfórico, ácido acético glacial e hidróxido de sódio da Merck e ácido bórico da Reagen Quimibrás (São Paulo, Brasil). Acetato de amônio usado no preparo de tampão para análises cromatográficas foi obtido da Merck.

O nitrogênio comercial (99,96 %) utilizado para purgar o interior do espectrômetro de luminescência foi adquirido na AGA-Lynde (Rio de Janeiro, Brasil). Um sistema para desoxigenação consistiu em duas soluções¹¹⁰ em linha, cuja composição era metavanadato de amônio (Química Moura, Brasil), ácido clorídrico P.A. (Merck), zinco em pó da (Vetec) e mercúrio metálico (F. Maia). 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 - Rio de Janeiro, 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. Micropipetas reguláveis de 100 a 1000 µL e de 20 a 200 µL Brand (Wertheim, Alemanha) e balões volumétricos de 10,00 mL e 5,00 mL foram utilizados no preparo das soluções. Todas as micropipetas e os balões volumétricos de 10,00 mL foram calibrados em um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (Laboratório de caracterização de fluídos – LCF/PUC-Rio), conforme certificados nos anexos I, II e III. Microseringa de vidro (Hamilton, Reno, Nevada, EUA) de 25 µL foi usada para carregar a alça de amostragem do cromatógrafo.

Os substratos sólidos utilizados para indução de fosforescência foram feitos com o papel Whatman 42 da Whatman Ltda (Inglaterra), sendo previamente tratado para a redução do sinal de fundo¹¹¹.

Capilares de sílica fundida para as análises por eletroforese capilar foram adquiridos da Agilent Technologies (Califórnia, EUA) e da Simplus Capillaries (Nova Jersey, EUA). As dimensões dos capilares foram 75 µm de diâmetro interno e 60 cm de comprimento total (51,5 cm até o detector). Os capilares da Agilent já estavam prontos para uso. Já os capilares da Simplus Capillaries foram preparados com o corte no tamanho desejado e remoção do revestimento de poliamida para abrir a janela de detecção e as extremidades do capilar que ficam em contato com as soluções do eletrólito de corrida que fecham o circuito

do sistema. Copos de polipropileno (1 mL), um kit de detecção de alta sensibilidade (capilares especiais e cela de caminho óptico alongado), alinhadores e cassetes (compartimento que acopla o capilar ao equipamento) foram adquiridos da Agilent Technologies.

As soluções utilizadas em eletroforese capilar e em cromatografia em fase líquida foram previamente passadas por filtros de membrana de PTFE de porosidade 0,45 μm e diâmetro igual a 17 mm (National Scientific, Michigan, EUA). A membrana de PTFE foi previamente molhada com metanol antes da passagem de soluções aquosas. Para os testes em saliva e em urina, utilizou-se coluna de extração em fase sólida C-18 (500 mg e 3 mL) (Varian, Califórnia, EUA) e sulfato de amônio da Vetec (Brasil).

3.2 Soluções

3.2.1 Soluções usadas nos experimentos com fosforimetria e fluorimetria

Para os estudos iniciais das características fosforescentes do harmane e norharmane, soluções na concentração de $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando como solvente o metanol. No entanto, após o estudo do efeito da polaridade do solvente na intensidade do sinal passou-se a utilizar a proporção 1:3 (v/v) de metanol:água.

Para os estudos das características fosforescentes em pH ácido e em pH básico, foram utilizadas respectivamente as misturas metanol:ácido clorídrico (1:3, v/v) e metanol:hidróxido de sódio (1:3, v/v) para dissolver o harmane e o norharmane, sendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a concentração final do ácido e da base utilizada.

As soluções de harmine, harmol, harmalol, harmaline foram preparadas da mesma forma acima, porém utilizando diretamente a água como solvente, em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (no caso do estudo em pH ácido) e em NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (no caso do estudo em pH básico). Em todos os casos, o solvente foi escolhido levando em consideração a solubilidade das substâncias em estudo.¹¹²

Soluções estoque de AgNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, TlNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, HgCl_2 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ e de surfactante dodecil sulfato de sódio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em balões volumétricos utilizando água ultrapurificada como solvente. Quando necessário, soluções de diferentes concentrações eram preparadas a partir destas.

Para estudar o efeito do tratamento prévio com radiação ultravioleta no sinal fosforescente ou fluorescente dos analitos, soluções destes foram colocadas em tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura) e posicionadas no centro do reator fotoquímico por 30 min.

Estudo mais detalhado do efeito do pH foi realizado utilizando o tampão Britton-Robinson¹⁰⁹, que foi preparado misturando-se quantidades iguais das soluções de H_3PO_4 0,04 mol L⁻¹, CH_3COOH 0,04 mol L⁻¹ e H_3BO_3 0,04 mol L⁻¹ com adição de volume apropriado de NaOH 0,2 mol L⁻¹ para atingir o pH desejado. Assim, soluções de diferentes valores de pH foram feitas na proporção 1:3 (v/v) de tampão:solução estoque de analito. Para o estudo do efeito do volume de solução tampão, preparou-se soluções com diferentes proporções de tampão e solução do analito em balões volumétricos de 10 mL.

Os testes para verificar uma possível emissão fosforescente diretamente em soluções aquosas foram realizados com o harmane, harmine e com o harmol $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, tendo KI 0,20 mol L⁻¹ e TINO_3 0,25 mol L⁻¹ como sais de átomos pesados, além do surfactante dodecil sulfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ e Na_2SO_3 0,10 mol L⁻¹ (para eliminar a interferência do oxigênio dissolvido na solução).

Na determinação dos analitos em amostras de urina, em todos os casos foram usados 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para um volume final de 10 mL de amostra de urina fortificada com os analitos (procedimento de *clean up*¹⁴²) em tubos de centrífugas graduados. O volume de analito adicionado variava conforme a concentração final desejada. As soluções finais (contendo sulfato de amônio, urina e analito) foram submetidas à centrifugação por 15 min e os sobrenadantes passaram por extração em coluna C-18, sendo então utilizados para leituras de fosforescência em substrato sólido, conforme os procedimentos otimizados. Os padrões da curva analítica usados para quantificação passaram pelo mesmo procedimento de filtragem.

Na determinação de harmane e harmine, formulações farmacêuticas simuladas foram preparadas pela maceração (em gral de porcelana) de amostras de comprimidos de preparação farmacêutica (Talidomida CEME[®]) e adição de uma quantidade de massa conhecida de analito. A mistura sólida obtida foi dissolvida em metanol e transferida e avolumada em um balão volumétrico de 25 mL. Após filtração em papel de filtro da marca Qualy, da solução límpida obtida foi retirada uma alíquota que foi transferida para outro balão volumétrico e avolumada com o sistema de solventes apropriado. Esta solução final foi utilizada para medida de fosforescência em substrato sólido

utilizando os procedimentos otimizados. Procedimento de interpolação em curva analítica foi usado para quantificação.

Nas análises de interferência, foram preparadas soluções com diferentes proporções de interferente:analito e os seus sinais fosforescentes comparados com aqueles obtidos em soluções padrões de referência. Nas determinações de harmone e harmine em chás, três diferentes tipos foram selecionados: camomila, capim cidreira e erva-doce, todos obtidos no comércio local.

Soluções de CPT ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em metanol / água 30/70% v/v. Soluções de cloridrato de irinotecana ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram feitas em água e soluções de cloridrato de topotecana ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) por dissolução de uma quantidade conhecida de sua fórmula farmacêutica diretamente na água. Todos os padrões de CPT e soluções de amostras foram preparados por pesagem do padrão ou amostras e solventes em balança analítica e mantidas no escuro sob refrigeração de até 4°C por no máximo cinco dias. Soluções padrão com concentrações mais baixas foram feitas por diluição das soluções estoque com água / tampão Britton-Robinson ou hidróxido de sódio em solução aquosa. Uma proporção final de 40% de tampão, em volume, foi utilizada como parte do teor de água do sistema de solvente usado para preparar as soluções de trabalho. As amostras de formulações farmacêuticas simuladas foram preparadas pela adição de diferentes quantidades de formulações farmacêuticas de camptotecina, irinotecana e topotecana.

3.2.2

Soluções usadas nos experimentos com cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

As soluções estoque da camptotecina e de seus derivados (irinotecana e topotecana) foram preparadas conforme já descrito no item 3.2.1. O método (MEKC) foi desenvolvido utilizando soluções de trabalho preparadas por meio da diluição das soluções estoque em solução contendo 75%, em volume, de tampão borato $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH= 8,8) e 25% de água ultrapurificada.

O eletrólito de corrida (BGE) foi preparado diariamente pela diluição de soluções-estoque aquosas de SDS ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e de ácido bórico ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) com adição de acetonitrila 7,5% v/v (modificador orgânico) e ajuste de pH para o valor otimizado (pH = 8,8).

As amostras de saliva foram obtidas de dois voluntários saudáveis, não-fumantes e que não receberam qualquer tratamento médico prévio a essas experiências por no mínimo três meses. Os voluntários lavaram suas bocas por

5 min com água ultrapurificada e 2,0 mL de saliva foram imediatamente coletados para um tubo de centrifuga graduado. Cada uma dessas amostras foi misturada em vórtex durante 15 s, e 1,3 mL de uma solução deproteinizante (ACN-MeOH, 1:1, v/v) foram adicionados antes de avolumar com 5 mL de solução de água/ácido bórico $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,8) 1:3, v/v. As amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 min a 3.200 rpm. Em seguida, cada uma delas foi misturada novamente durante 15 s em vórtex e centrifugada por mais 10 minutos e, finalmente, este passo foi repetido mais uma vez (o tempo total de centrifugação foi de 30 min). O mesmo procedimento foi feito para amostras de saliva fortificadas com quantidades conhecidas de CPT, CPT-11 e TPT. Estas amostras fortificadas foram filtradas em um filtro 0,45 μm de PTFE e transferidas para frascos de 1 mL.

3.2.3 Soluções usadas em cromatografia líquida (HPLC)

A fim de comparar os percentuais de recuperação encontrados na fluorimetria, as amostras de medicamento contendo CPT, CPT-11 e TPT foram analisadas por HPLC usando o método proposto por Guo *et al*³² no qual a fase móvel tinha dois componentes: acetonitrila e acetato de amônio $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,5). O tampão de acetato ($2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparado pela dissolução de acetato de amônio em água e o pH ajustado para 3,5 com ácido acético. A fase móvel, na vazão de 1 mL min^{-1} foi bombeada no modo isocrático com 24% de acetonitrila (v/v) por 2,7 min. Depois, um gradiente de eluição foi aplicado aumentando a proporção de acetonitrila de 24 para 29% em 2,3 min seguido pelo aumento de acetonitrila de 29 para 34% em 2 min, e depois de 34 para 90% em 1 min. Finalmente a proporção de acetonitrila foi reduzida de volta para 24% em 1 min. O percentual de cada componente da fase móvel ao longo do tempo está na Tabela 3. Usando estes parâmetros, o tempo de retenção da camptotecina foi de 7,8 min.

Tabela 3: Percentual de cada componente da fase móvel ao longo do tempo

Intervalo de tempo (min)	% ACN	% Tampão de acetato (pH 3,5)
0 – 2,7	24	76
2,7 – 5,0	29	71
5,0 – 7,0	34	66
7,0 – 8,0	90	10
8,0 – 9,0	24	76

3.2.4 Soluções usadas nos estudos de incerteza

Para os estudos de incerteza, a solução de criseno $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em etanol. Soluções mais diluídas de criseno foram preparadas a partir da solução-mãe usando etanol / água 50/50% v/v. As soluções de SDS $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e AgNO_3 $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em água.

3.3 Instrumentação

3.3.1 Instrumentação usada nas medições de fosforescência ou fluorescência

3.3.1.1 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), o qual tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com 8 μs de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5 sensível para detectar radiação até 900 nm. Monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão.

Um acessório de medição em superfície sólida foi usado para realizar as medições de fosforescência em substrato sólido. Este acessório foi acoplado no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência. Banda espectral de passagem de 10 nm e velocidade de varredura de 1500 nm mm^{-1} foram usadas. Os comprimentos de onda referentes à excitação e à emissão

fosforescentes variaram de acordo com o analito (β -carbolinas), o pH e o íon de átomo pesado usado.

O sistema de detecção deste instrumento possibilitou o ajuste temporal de aquisição de sinal (tempos de atraso e de abertura de detecção), discriminando o sinal de maior tempo de vida (fosforescência) do ruído de tempo mais curto (espalhamento e fluorescência). Os valores usados nesse estudo foram de 3 ms para o tempo de abertura e de 3 ms para o tempo de atraso na detecção.

Apesar de no espectrômetro LS-55 também serem possíveis medições de fluorescência, estas foram feitas em espectrômetro de luminescência comercial da Perkin-Elmer modelo LS-45 (Beaconsfield, UK). Assim como no LS-55, os espectros de fluorescência foram obtidos em computador usando o programa FLwinlab®. Uma banda espectral de passagem de 10 nm e velocidade de varredura de 1000 nm mm⁻¹ foram usadas. A camptotecina foi detectada usando varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 82$ nm. Para amostras contendo topotecana, a detecção foi feita em 368 nm enquanto que para amostras contendo CPT-11, a detecção foi feita no comprimento de onda isodiferencial igual a 267 nm (λ_{iso}), usando a segunda derivada do espectro sincronizado. Cubetas de quartzo (caminho óptico de 1 cm) foram usadas para colocar amostras e brancos.

3.3.1.2 Reator fotoquímico

Um reator fotoquímico, cuja foto é mostrada na Figura 13a, foi construído no próprio laboratório, utilizando uma carcaça de estufa com o uso de um conjunto de seis lâmpadas de vapor de mercúrio de 6 W (lâmpadas de esterilização) e dispostas em meia lua na cavidade superior interna do aparato. As lâmpadas de mercúrio utilizadas são comercialmente disponíveis para esterilização bacteriológica com emissão mais intensa em 253 nm e na faixa entre 296-313 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 utilizados como substratos sólidos em SSRTP foram irradiados já cortados em círculos de 18 mm de diâmetro (Figura 13b).



Figura 13: (a) Reator fotoquímico e (b) detalhe dos papéis sendo irradiados.

3.3.1.3 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, seguido de secagem sob luz de lâmpada infravermelha de 150 W (Phillips, Brasil)⁷³.

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 13b.

3.3.2 Instrumentação usada nas separações por cromatografia

Um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (Waters Breeze, Massachusetts, EUA) foi utilizado nos testes de comparação com o método fluorimétrico para CPT e derivados. O sistema foi constituído por uma bomba binária modelo 1525, um forno, e um detector de fluorescência (modelo 2478) que possui uma grade de excitação e de emissão e lâmpada de xenônio de fonte contínua e capacidade de medição de sinal em dois canais, sendo, nesse trabalho, utilizado apenas um único canal com o comprimento de onda de excitação/emissão fixos em 368/450 nm. A injeção foi feita manualmente por meio de um sistema “Reodyne” e alça de amostragem de 20 μ L. O tratamento dos dados, integração dos picos e resultado final foi processado pelo software Breeze do próprio equipamento.

As separações foram feitas em uma coluna X-Terra RP C18 (Waters) 4,6 x 150 mm com partículas de 5 μ m, a qual foi mantida dentro do forno do equipamento, a 35 $^{\circ}$ C.

Para os testes de validação do método desenvolvido por MEKC para a camptotecina e seus derivados, as análises cromatográficas foram feitas usando

o sistema Perkin-Elmer HPLC (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, EUA) equipado com a bomba Series 200 LC e um detector de fluorescência com o comprimento de onda de excitação/emissão fixos em 368/450 nm. As amostras foram injetadas através de um *autosampling* Series 200 LC e alça de amostragem de 20 μL .

3.3.3

Instrumentação usada nas separações por eletroforese capilar

Os experimentos feitos por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) foram realizados em um equipamento comercial Hewlett – Packard (HP) CE – Agilent (Agilent, California, EUA), que era equipado com detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; um sistema automático de injeção de amostra e programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent.

As determinações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (51,5 cm até o detector) e 75 μm de diâmetro interno, devidamente adaptado ao alinhador (Figura 14) e ao cassete que protege o capilar (Figura 15). Os eletroferogramas foram obtidos com detecção por absorção ajustada em 368 nm. O potencial aplicado durante a corrida, foi de 25 kV e a temperatura mantida constante em 25 $^{\circ}\text{C}$. As injeções das amostras no capilar foram realizadas pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 75 segundos para realizar o modo de pré-concentração no capilar.

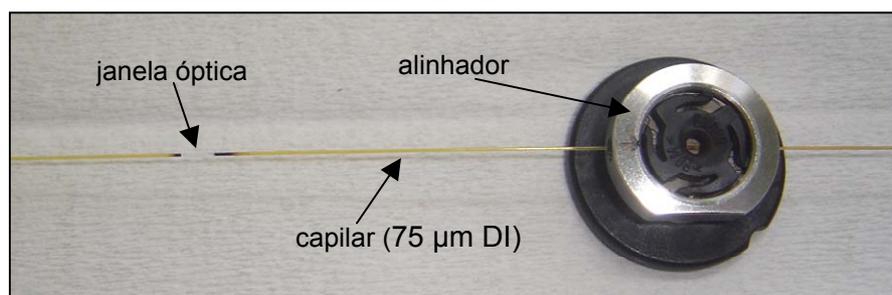
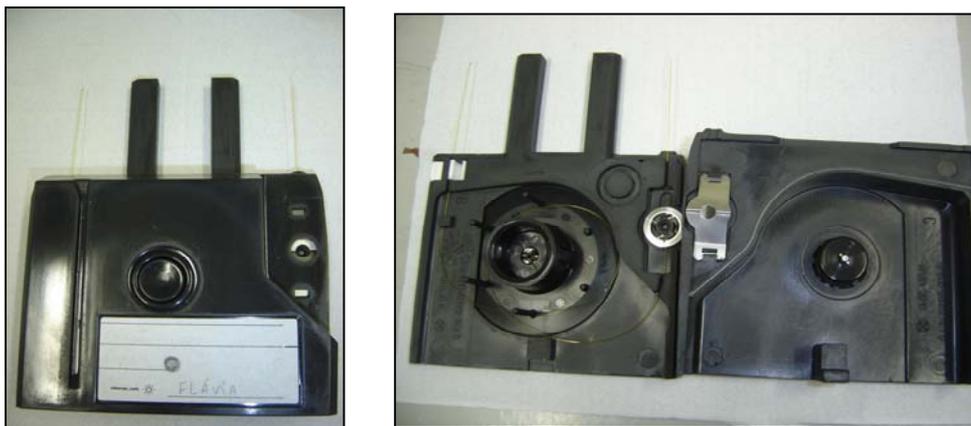


Figura 14: Sistema composto por capilar com janela óptica feita manualmente e alinhador

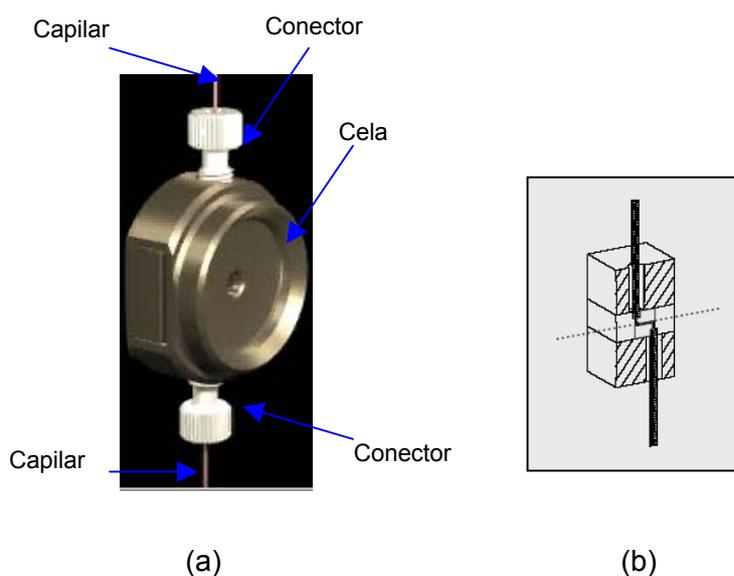


(a)

(b)

Figura 15: (a) Cassete fechado já contendo o capilar; (b) interior do cassete com o capilar e seu respectivo alinhador adaptados.

Com a finalidade de aumentar o sinal analítico da camptotecina, irinotecana e principalmente da topotecana foi utilizada uma cela de caminho óptico alongado (formato em Z). Para o uso dessa cela, um kit com todos os aparatos necessários para sua adaptação foi utilizado (Agilent). O kit era constituído de um capilar (75 μm de diâmetro interno) de sílica fundida dividido em duas partes (adaptadas à cela), conectores para adaptação do capilar à cela, além de uma solução de limpeza Hellmanex 2% v/v e um frasco de ar comprimido para limpeza e secagem da cela. A Figura 16a mostra uma foto da cela de caminho óptico alongado e os aparatos necessários para sua instalação e a Figura 16b mostra um desenho esquemático do interior da cela.



(a)

(b)

Figura 16: (a) Cella com caminho óptico alongado com os aparatos adaptados e (b) formato em Z no interior da cela.

3.3.4 Outros equipamentos auxiliares

Um sistema de vácuo foi utilizado para a secagem dos substratos de papel, após a deposição das soluções de analito e de átomo pesado. O sistema era constituído de um dessecador de polietileno coberto com papel alumínio, de modo a impedir que os substratos ficassem expostos à luz ambiente. Esse dessecador foi acoplado a uma bomba de vácuo modelo 820 da Fisatom (Brasil), sendo um frasco erlenmeyer instalado entre o dessecador e a bomba (armadilha de segurança para coletar refluxo de óleo da bomba). O vácuo foi medido por meio de um manômetro, sendo a pressão interna menor ou igual a 25 Pol Hg. Os substratos de papel foram deixados nesse sistema por um período de 2 h antes das medições.

Para as medidas de pH das soluções e para o preparo dos tampões Britton-Robinson¹⁰⁹, foi utilizado um medidor de pH fornecido pela Tecnoyon (São Paulo, Brasil), modelo MPA 210, versão 2.3. O eletrodo utilizado foi do tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de Ag/AgCl. O equipamento foi calibrado diariamente com soluções-tampão de pH 4,00 a 7,00, fornecidas pela Merck (Brasil).

Uma centrífuga modelo BE 4000 Brushless (Bio-Eng, Rio de Janeiro) foi utilizada no processo de limpeza (*clean up*) das amostras de urina e saliva.

Todas as massas necessárias para o preparo das soluções foram pesadas em uma balança eletrônica Mettler AT261 calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro, Brasil), conforme Anexo IV.

Para a melhor dissolução de alguns solutos foi necessário o uso de um banho ultra-sônico (modelo USB124, de potência 40 W, proveniente da CTA do Brasil, São Paulo, Brasil).

A degaseificação dos solventes da fase móvel para HPLC foi feita em um banho ultra-sônico de 9 L, modelo NSC2800 (Unique, São Paulo, Brasil).

3.4 Procedimentos gerais

3.4.1 Limpeza do material

Toda a vidraria foi lavada com água corrente e deixada imersa em solução aquosa de ácido nítrico 10 % v/v por um período mínimo de 24 h. Esse material

foi enxaguado com água destilada e posteriormente com água ultrapurificada, seco e mantido em recipientes fechados.

3.4.2

Preparação de substrato de celulose de baixo sinal de fundo usado em SS RTP

Para reduzir o sinal de fundo dos substratos de celulose foi necessário submetê-los a um procedimento que consiste primeiramente em uma etapa de lavagem com água em extrator Soxhlet (duração de duas horas). Após secagem sob lâmpada infravermelha (30 min), os papéis foram cortados em círculos de 18 mm de diâmetro, os quais foram expostos à radiação ultravioleta em um reator fotoquímico (Figura 13b) por duas horas. Esse procedimento foi adaptado de Cardoso *et. al.*¹¹³

3.4.3

Procedimento geral para medição do sinal fosforescente

Para a medição da fosforescência, volumes de 5 μL das seguintes soluções foram depositados na superfície do substrato sólido, com o auxílio de micropipeta, necessariamente nesta ordem: solução de surfactante (quando necessária), solução de sal de metal pesado (quando utilizado) e solução de amostra ou branco (Figura 17). Um gabarito demarcado para indicação de posição de amostra foi usada para auxiliar esse procedimento.

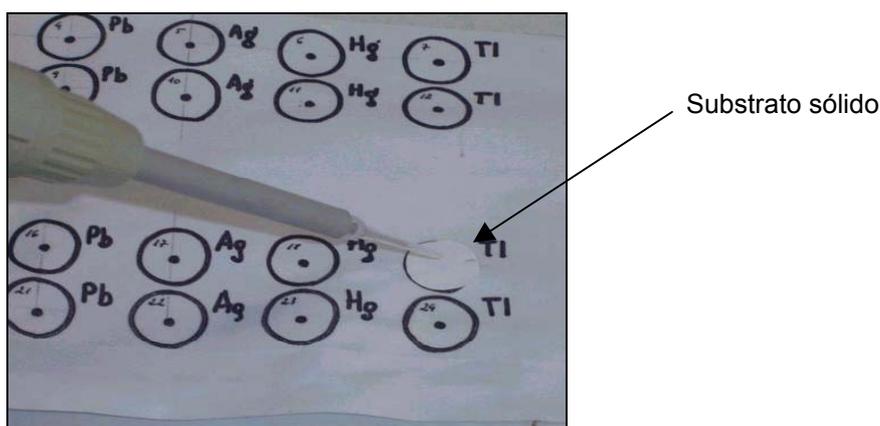


Figura 17: Aplicação das soluções no substrato sólido com auxílio de planilha demarcada para indicação de posição de amostra.

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 18a), que foi acoplado ao aparato de medição em superfície sólida (Figura 18b) que fica no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência. O substrato foi purgado, por um período de 2 min, com um fluxo de N₂ 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.

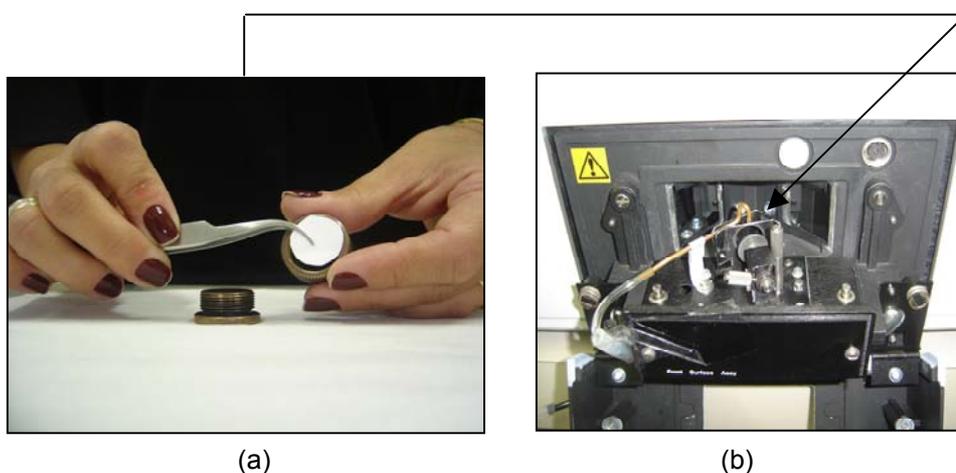


Figura 18: (a) Colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida

3.4.4

Procedimento geral para medição do sinal fluorescente e para separações por eletroforese capilar

As medidas de intensidade fluorescente foram feitas após 10 s de exposição à radiação de excitação, a fim de compensar qualquer flutuação de sinal. As cubetas de quartzo foram lavadas com solução de ácido nítrico 1 mol L⁻¹ e água ultrapurificada antes de cada medição.

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o da cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), que utiliza fase pseudoestacionária carregada (micelas de surfactante, no caso desse trabalho) para a separação e identificação de compostos neutros. O SDS foi utilizado como surfactante para formação de micelas carregadas negativamente.

Para as determinações da camptotecina e seus derivados, o eletrólito de corrida foi preparado diariamente pela mistura de solução de ácido bórico (concentração final no eletrólito de $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), solução aquosa de SDS (concentração final no eletrólito igual a $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e modificador orgânico (7,5 % em volume de acetonitrila). O pH dessa solução de eletrólito foi ajustado para o valor de 8,8 pela adição de solução aquosa de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Durante o ajuste de pH com NaOH, a solução foi mantida em constante agitação e o valor de pH monitorado.

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente a partir das soluções-estoque. Nos estudos para otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais, os analitos foram injetados por pressão de 50 mbar durante 15 s.

No início de cada dia de trabalho, previamente às injeções das soluções dos analitos, o capilar de sílica fundida foi condicionado. Esse procedimento consistia da passagem de acetonitrila por 5 min, seguida de 5 min de água ultrapurificada, 15 min de solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, espera de 2 min e finalmente 15 min de água ultrapurificada. Esse condicionamento foi feito pela injeção das soluções com pressão de 50 mbar. Um pré-condicionamento mais simples foi feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho. Esse condicionamento foi fundamental para que se garantisse a reprodução de resultados e consistia de passagem de água ultrapurificada por 1 min; acetonitrila por 1 min; novamente água ultrapurificada por 1 min; 1,5 min de solução de NaOH 1 mol L^{-1} e 2 min de eletrólito de corrida. A cada oito corridas e ao final de cada dia, foi realizado um procedimento de limpeza do capilar, com a passagem, em sequência, de acetonitrila (5 min), água ultrapurificada (5 min) e solução de acetonitrila: água 50:50 % v/v (5 min). Após cada dia de trabalho, o capilar foi guardado com as pontas imersas dentro de frascos (*vials*) de polipropileno contendo solução de acetonitrila: água 50:50% v/v.

Com o objetivo de aumentar as áreas dos picos da camptotecina, da irinotecana e principalmente da topotecana, foi realizado um procedimento de pré-concentração em linha, no qual os parâmetros otimizados foram: tempo de injeção de 75 s, potencial aplicado de 25 kV e temperatura mantida em 25°C. A corrente medida nessas condições foi tipicamente em torno de 48 μA . Os eletroferogramas foram obtidos com medição de absorvância em 368 nm. Todas as soluções (padrões e eletrólito) foram filtradas em filtros PTFE de 0,45 μm , previamente condicionados com metanol, antes de serem analisados no equipamento de eletroforese capilar.

Para a validação do método de determinação de harmone por SS RTP⁷², as seguintes condições foram usadas para MEKC: potencial aplicado de 25 kV; temperatura de 30 °C; injeção feita a 50 mbar por 10 s. O eletrólito de corrida era preparado diariamente e consistia de tampão de borato $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) contendo SDS ($5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 15% de acetonitrila, em volume. O pico de absorção do analito foi detectado a 254 nm. Sempre ao início de cada dia de trabalho, o seguinte procedimento de condicionamento foi usado: (i) solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min; (ii) espera por 2 min; (iii) água ultrapurificada por 10 min; (iv) solução de acetonitrila/água ultrapurificada/tampão de borato (14/29/57%, v/v/v) por 10 min; (v) tampão de borato (pH 9,0) por 2 min. Antes da injeção de cada amostra, padrão ou branco, o seguinte pré-condicionamento foi usado: (i) acetonitrila por 1 min; (ii) água ultrapurificada por 1 min; (iii) solução de NaOH 1 mol L^{-1} por 2 min; (iv) água ultrapurificada por 1 min; (v) tampão de borato (pH 9,0) por 1 min. A cada cinco corridas, um procedimento de limpeza foi usado para garantir a qualidade da separação: (i) acetonitrila por 5 min; (ii) solução de NaOH 1 mol L^{-1} por 3 min; (iii) água ultrapurificada por 5 min. Este procedimento foi adaptado de Cheng e Mitchelson.¹¹⁴

3.4.4.1

Uso da cela de caminho óptico alongado

A cela de caminho óptico estendido foi montada de acordo com informações contidas no manual do fabricante (Agilent). Um capilar especial de 72 cm de comprimento total foi utilizado. Esse capilar era dividido em duas partes, uma parte maior de 63,5 cm de comprimento (distância até a janela de detecção) e a outra parte menor de 8,5 cm (distância entre a janela e o lado de saída da amostra do capilar). Antes de serem acopladas à cela, as duas partes do capilar foram devidamente ajustadas aos dois pequenos conectores (previamente limpos com ar comprimido). Esses conectores com os capilares foram adaptados à cela, que em seguida foi colocada no cassete (suporte para cela com o capilar) que foi devidamente adaptado ao equipamento de eletroforese capilar. A Figura 16 mostra o capilar acoplado à cela de caminho óptico alongado.

A solução de limpeza Hellmanex II fornecida pelo fabricante do equipamento (Agilent) foi devidamente preparada por meio da diluição de 0,5 mL da solução em 12,5 mL de água ultrapurificada. Os parafusos e a cela foram imersos nessa solução e deixados no banho ultra-sônico por 15 minutos e em

seguida por mais 10 minutos em água ultrapurificada, antes de serem utilizados, para remoção de partículas que pudessem atrapalhar a passagem da solução pela cela de caminho óptico alongado.

Para o uso dessa cela, os procedimentos de condicionamento, pré-condicionamento, posterior limpeza do capilar e de injeção foram realizados da mesma forma como descrito anterior (item 3.4.4).

3.4.4.2 Pré-concentração da amostra em linha

O procedimento de pré-concentração de analito em linha, denominado de modo normal de empilhamento (NSM), foi realizado como indicado no trabalho de Pérez et al¹¹⁵. A pré-concentração NSM envolve a utilização de micelas carregadas negativamente, sendo o modo mais simples de pré-concentração de amostra no capilar (*on-line*).

A pré-concentração da amostra no capilar envolveu a dissolução dos analitos em uma matriz de baixa condutividade em relação ao eletrólito de corrida, permitindo que o processo de acumulação em zona ocorra devido à diferença de campo elétrico entre as zonas de amostra e o eletrólito de trabalho¹¹⁶.

A matriz de baixa condutividade onde os analitos foram dissolvidos foi otimizada com propósito de obter maior sinal analítico da camptotecina e seus derivados. O melhor sinal analítico foi obtido com preparação de amostra em água ultrapurificada: tampão borato ($2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH = 8,8) 25:75% v/v. Após a otimização da matriz, o tempo de injeção da solução foi otimizado (75 s foi escolhido). Injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, potencial aplicado de 25 kV e temperatura mantida em 25 °C foram as condições usadas.

3.4.5 Procedimento geral para as separações feitas por cromatografia líquida de alta eficiência

A fim de comparar os percentuais de recuperação encontrados nas amostras analisadas por MEKC, as mesmas foram também analisadas por HPLC segundo o que já foi descrito no item 3.2.3.

A temperatura do forno foi mantida em 30 °C. Amostras e soluções foram injetadas no sistema de injeção por meio de uma micro-seringa de 25 µL. Antes de iniciar as injeções, a coluna cromatográfica foi condicionada com a fase

móvel até a estabilização da pressão. Os solventes (acetonitrila, água ultrapurificada e tampão acetato de amônio) foram previamente desgaseificados em banho de ultra-som por no mínimo 20 min e filtrados em membrana de 0,45 µm.

As soluções de calibração foram preparadas a partir da solução estoque de cada analito preparada em água ultrapurificada. Alíquotas dessa solução foram diluídas em água ultrapurificada e passadas por filtros para seringa antes de serem injetadas no cromatógrafo.

3.5 Programas utilizados

Cálculos estatísticos foram feitos usando Microsoft Office Excel (Microsoft, Brasil) e Origin 6.0 e planejamentos experimentais e tratamentos dos dados foram gerados no Statistica 7.0 (StatSoft, EUA).