

5

β -Carbolinas – Desenvolvimento de Métodos e Resultados

5.1

Informações preliminares

Estudos recentes com substâncias derivadas da β -carbolina têm mostrado grande potencial destas substâncias no tratamento de várias doenças. Além disso, a presença de derivados das β -carbolinas pode estar relacionada com diversas disfunções fisiológicas, requerendo ferramentas analíticas para seu monitoramento. Sendo assim, uma proposta de desenvolver uma metodologia para a determinação de harmane e harmine por meio da SS RTP foi cumprida de forma satisfatória por Marques, FFC⁷³. No trabalho de doutorado, o objetivo foi o de expandir esses estudos para a avaliação de seletividade da detecção de uma β -carbolina na presença de outras usando SS RTP, evitando a separação prévia de componentes. Para tal, dois estudos de caso foram feitos: (i) a determinação seletiva de harmol na presença de quatro outras β -carbolinas e (ii) determinação de harmane na presença de harmine em chás.

Para tal, seguindo a mesma linha de pesquisa desenvolvida por Marques, FFC⁷³ para o harmane e o harmine, estudos foram feitos para verificar as características fosforescentes de cada uma das demais β -carbolinas (harmol, harmaline, harmalol e norharmane). Feito isto, o harmol passou a ser o analito de interesse principal por fazer parte de uma rota metabólica (Figura 6) que ocorre no fígado, na qual o harmane é transformado em harmine. Posteriormente, sabendo-se que os alcaloides indólicos podem ocorrer também em diversas plantas e, devido à sua importância toxicológica, foi de interesse o desenvolvimento de um método analítico seletivo para a determinação de harmane na presença de harmine em chás.

O detalhamento de cada trabalho citado acima será feito nas seções seguintes.

5.1.1

Estudo das características fosforescentes do harmol, harmaline, harmalol e norharmane em substrato de celulose de baixo sinal de fundo

A capacidade fotoluminescente de uma substância depende tanto da sua estrutura molecular quanto das características do meio que a cerca. Assim sendo, as condições experimentais que afetam as características fosforescentes do harmol, harmaline, harmalol e norharmane em substrato de celulose foram estudadas⁹⁶. Mais especificamente avaliou-se o efeito dos seguintes parâmetros nas características espectrais (comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão e intensidade de sinal) das β -carbolinas: (i) a composição da solução carreadora da β -carbolina para o substrato de papel (solução ácida, solução básica e solução original sem adição de ácido ou base, cujo pH era em torno de 8), (ii) a presença de sais de átomos pesados (AgNO_3 , TlNO_3 , KI , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 e $\text{CdC}_4\text{H}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que têm potencial para atuar como indutores ou amplificadores de fosforescência e (iii) a presença do agente surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) no substrato.

5.1.1.1

Fosforescência em função da composição da solução carreadora

A solução carreadora é a solução na qual a substância fosforescente é dissolvida antes de uma alíquota desta ser depositada no substrato de celulose. Os sinais fosforescentes de harmol, harmaline, harmalol e norharmane no substrato sólido foram medidos após a adição dos mesmos a partir de soluções com pH ácido (HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$), com pH básico (NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e a partir de soluções em metanol/água ultrapurificada 25/75%, v/v para o caso do norharmane e somente água ultrapurificada para os demais derivados. A concentração final dos analitos nas soluções foi fixada em $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2 nmol depositados no substrato). Neste momento, não foi feito uso de surfactante ou sais de átomos pesados no substrato, pois o objetivo foi somente verificar se as β -carbolinas emitem sinal fosforescente imobilizadas no papel, sem o uso de nenhum outro artifício.

O volume de $5 \mu\text{L}$ das soluções dos analitos foi aplicado em substratos de papel Whatman 42. Cada solução foi depositada em três unidades de substrato de celulose para se ter a medição em triplicata. Após as medições de

fosforescência, as médias dos resultados foram calculadas e tabuladas (Tabela 26). Para efeito de comparação, os resultados encontrados por Marques, FFC⁷³ para o harmane e o harmine também foram inseridos na mesma Tabela 26.

Tabela 26: Fosforescência do harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane (2nmol de suas soluções depositados no papel) em função do pH

pH	$I_A - I_B^*$ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)					
	Harmane	Harmine	Harmol	Harmaline	Harmalol	Norharmane
Original	24 (251/498)	473 (250/500)	209 (250/495)	38 (254/503)	58 (254/498)	25 (254/503)
Ácido	29 (251/498)	630 (250, 498)	578 (250/493)	76 (252/503)	88 (254/499)	231 (254/503)
Básico	0	0	0	16 (252/497)	11 (254/506)	25 (250/501)

* $I_A - I_B$ corresponde à diferença entre os valores de sinal fosforescente do analito e do branco.

Na Tabela 26, os resultados em negrito mostram que o harmine, o harmol e o norharmane são os mais sensíveis à variação das condições da solução carreadora, emitindo sinais fosforescentes razoavelmente intensos em pH original (harmine e o harmol) e principalmente em pH ácido (harmine, harmol e norharmane). Já para o harmane, harmaline e harmalol, sinais fosforescentes de baixa intensidade foram observados no pH original da solução carreadora e em meio ácido. No meio básico, nenhuma ou quase nenhuma fosforescência foi obtida para estas substâncias. A Figura 61 mostra os espectros de excitação e emissão fosforescentes das β -carbolinas¹ depositadas no substrato a partir da solução em pH original. Na Figura 62, observam-se os espectros com adição das substâncias a partir de soluções carreadoras ácidas.

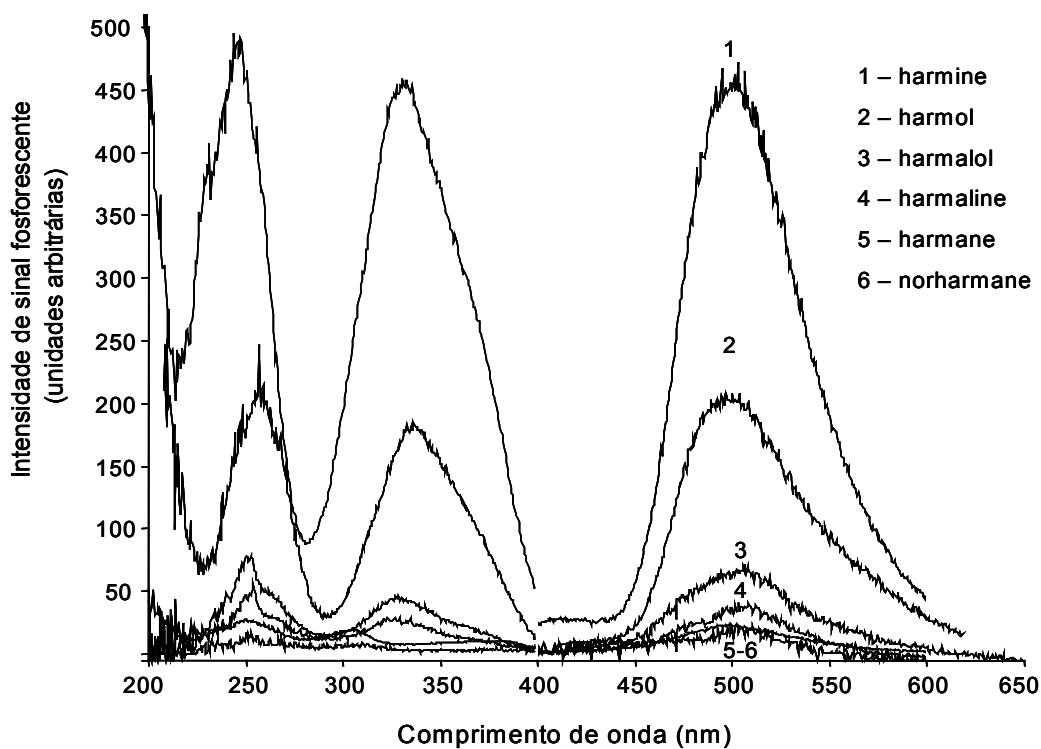


Figura 61: Espectros de excitação e emissão fosforescentes de soluções dos derivados das β -carbólinas em pH original, todas a $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2 nmol depositados no substrato sólido).

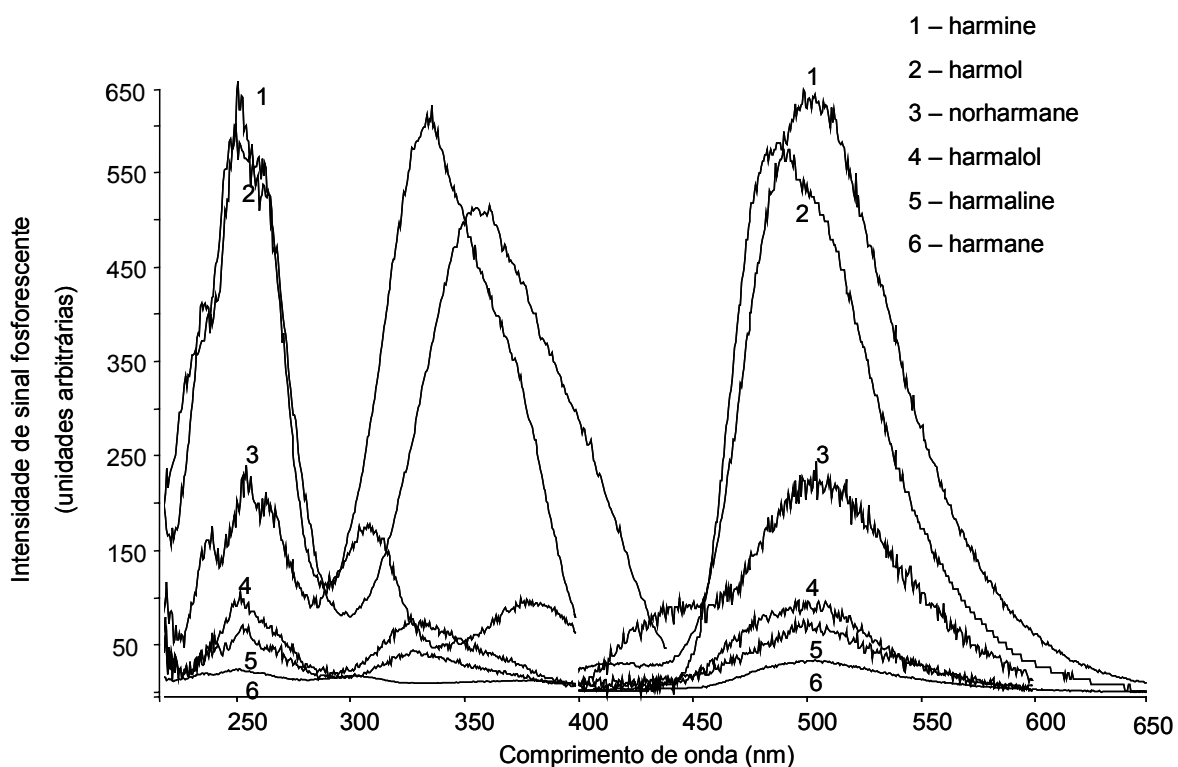


Figura 62: Espectros de excitação e emissão fosforescentes de soluções dos derivados das β -carbólinas em pH ácido, todas a $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2 nmol depositados no substrato sólido).

5.1.1.2

Fosforescência em função do efeito do átomo pesado e do pH

Com o intuito de proporcionar a amplificação da fosforescência por meio do aumento da velocidade do cruzamento intersistemas (modificação da multiplicidade do estado excitado, $S_1 \rightarrow T_n$)⁹⁴, 5 μL das soluções de sais de átomos pesados (AgNO_3 0,01 mol L^{-1} ; TlNO_3 0,25 mol L^{-1} ; KI 1,0 mol L^{-1} ; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,25 mol L^{-1} ; HgCl_2 0,20 mol L^{-1} ; $\text{CdC}_4\text{H}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,50 mol L^{-1}) foram adicionados separadamente aos substratos sólidos, previamente à deposição das soluções dos analitos. Como no estudo anterior, testaram-se soluções carreadoras nos três diferentes meios (ácido, básico e pH original da solução do analito). As medições foram feitas em triplicata (três papéis para cada situação). Um esquema simplificado da deposição das soluções é mostrado na Figura 63.

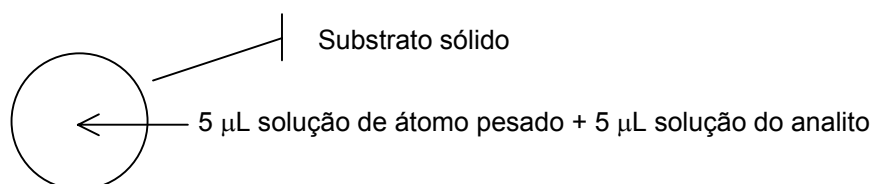


Figura 63: Esquema simplificado de adição das soluções de átomos pesados e de analitos no substrato sólido.

As médias dos resultados encontram-se na Tabela 27. Para efeito de comparação, os valores encontrados por Marques, FFC^{34} para o harmane e o harmine também foram inseridos na mesma Tabela 26.

Tabela 27: Efeito do átomo pesado e do pH na fosforescência do harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane (2 nmol de suas soluções depositados no papel).

Harmane						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	3356 (248/455)	737 (254/493)	12 (263/494)	0	40 (301/493)	92 (248/453)
Ácido	22 (250/504)	25 (249/496)	14 (253/507)	0	43 (301/494)	38 (249/462)
Básico	0	261 (284/594)	34 (250/501)	0	7 (301/487)	45 (289/448)
Harmine						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	1600 (336/451)	1018 (251/494)	127 (255/490)	152 (336/498)	351 (335/497)	252 (251/484)
Ácido	372 (336/504)	256 (250/500)	48 (251/502)	6 (336/500)	349 (330/497)	256 (250/492)
Básico	0	209 (300/596)	48 (251/595)	0	87 (336/489)	70 (325/457)
Harmol						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	453 (246/462)	117 (254/494)	91 (248/489)	438 (336/486)	110 (332/490)	182 (251/479)
Ácido	299 (335/491)	106 (249/491)	132 (332/492)	107 (338/491)	128 (332/492)	129 (250/491)
Básico	0	0	0	0	0	0

(continuação da Tabela 27)

Harmaline						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	74 (250/451)	61 (254/497)	18 (260/522)	14 (328/498)	21 (328/497)	56 (254/506)
Ácido	44 (252/497)	28 (253/506)	37 (259/522)	20 (328/498)	31 (326/497)	106 (252/504)
Básico	0	23 (288/581)	16 (262/525)	0	0	10 (252/503)
Harmalol						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	225 (250/330)	183 (254/494)	41 (260/487)	171 (336/486)	62 (328/501)	67 (254/503)
Ácido	49 (251/496)	26 (251/496)	34 (257/521)	12 (330/489)	30 (328/500)	88 (251/495)
Básico	11 (250/498)	9 (250/503)	21 (250/521)	0 (250/521)	0	9 (251/498)
Norharmane						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	Ag ⁺	Tl ⁺	I ⁻	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Original	428 (250/454)	59 (252/602)	41 (249/495)	8 (250/498)	21 (305/496)	30 (250/503)
Ácido	94 (254/498)	72 (254/503)	114 (254/504)	36 (311/509)	245 (306/501)	268 (255/499)
Básico	0	205 (289/603)	24 (259/522)	0	48 (290/606)	18 (252/501)

Já se havia observado sinais fosforescentes muito intensos para o harmane, a partir de soluções carreadoras em pH original, na presença de Ag(I) ou Tl(I). Comparando-se os valores da Tabela 26 com os da Tabela 27, pôde-se verificar amplificação de sinal de 139,8 e 30,7 na presença de Ag(I) e Tl(I), respectivamente. Em meio básico os valores não foram significativos e houve formação de precipitados amarelo e marrom na presença de Hg(II) e Ag(I)

respectivamente, impossibilitando a leitura do sinal fosforescente nestes casos. Em meio ácido, as intensidades não foram aumentadas. Também já havia sido constatado que os melhores sinais de fosforescência para o harmine também ocorrem em pH original, na presença dos íons Ag(I) (amplificação de sinal em 3,4 vezes) e Tl(I) (amplificação de sinal em 2,2 vezes).

No caso do harmol, houve uma amplificação de 2,1 vezes do sinal fosforescente, obtido com solução carreadora em pH original, na presença de Ag(I) e Hg(II). Em pH ácido os sinais foram todos reduzidos e em pH básico continuaram nulos. Já para o harmaline, não se observou resposta favorável com relação à presença de sal de átomo pesado, pois os valores de fosforescência obtidos nos três diferentes meios não foram significativamente maiores que os anteriores (Tabela 26). O harmalol, por sua vez, em pH original teve um aumento de 3,9; 3,2 e 2,9 vezes na presença dos íons Ag(I), Tl(I) e Hg(II), respectivamente. Nos meios ácido e básico nenhum resultado relevante foi observado com o uso do átomo pesado. O comportamento do norharmane também teve destaque, com um aumento de 17 vezes na presença de Ag(I) em pH original e 8,2 vezes em meio básico com Tl(I). No meio ácido não foi encontrada nenhuma situação favorecida pelo uso de sais de átomos pesados.

Comparando os seis derivados das β -carbolinas, o efeito do átomo pesado foi muito mais significativo para o harmane e o norharmane, visto que provocou uma amplificação de sinal muito maior, muito embora benefícios também foram observados no caso dos demais (com exceção do harmaline). É importante esclarecer que estes resultados visaram somente o sinal de cada analito individualmente, não estabelecendo nenhuma relação com a seletividade relativa.

Espectros de excitação e de emissão fosforescentes dos seis derivados das β -carbolinas, preparadas em solução sem adição de ácido ou de base, em substrato contendo Ag(I) ou Tl(II) são mostrados na Figura 64 e na Figura 65, respectivamente.

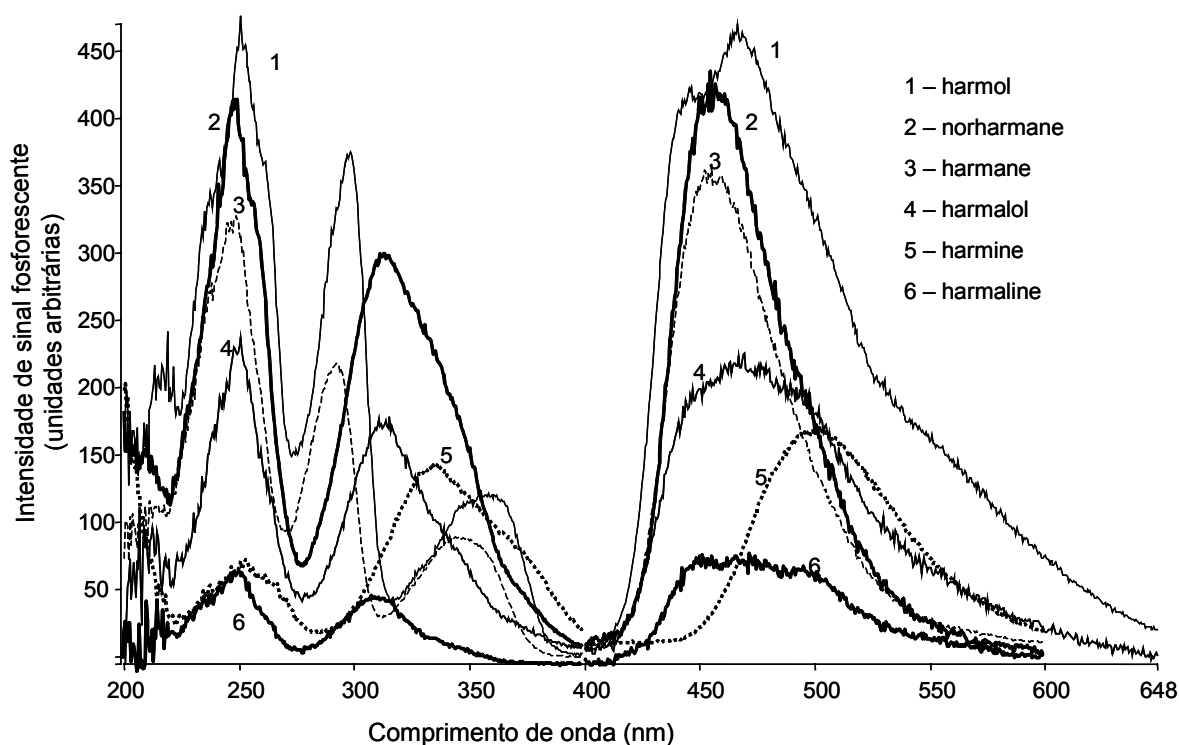


Figura 64: Sobreposição dos espectros de excitação e emissão fosforescentes dos seis derivados das β -carbólinas em pH original de suas soluções (2 nmol depositados no papel) e com o uso de AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (8,5 μg depositados no papel) como átomo pesado.

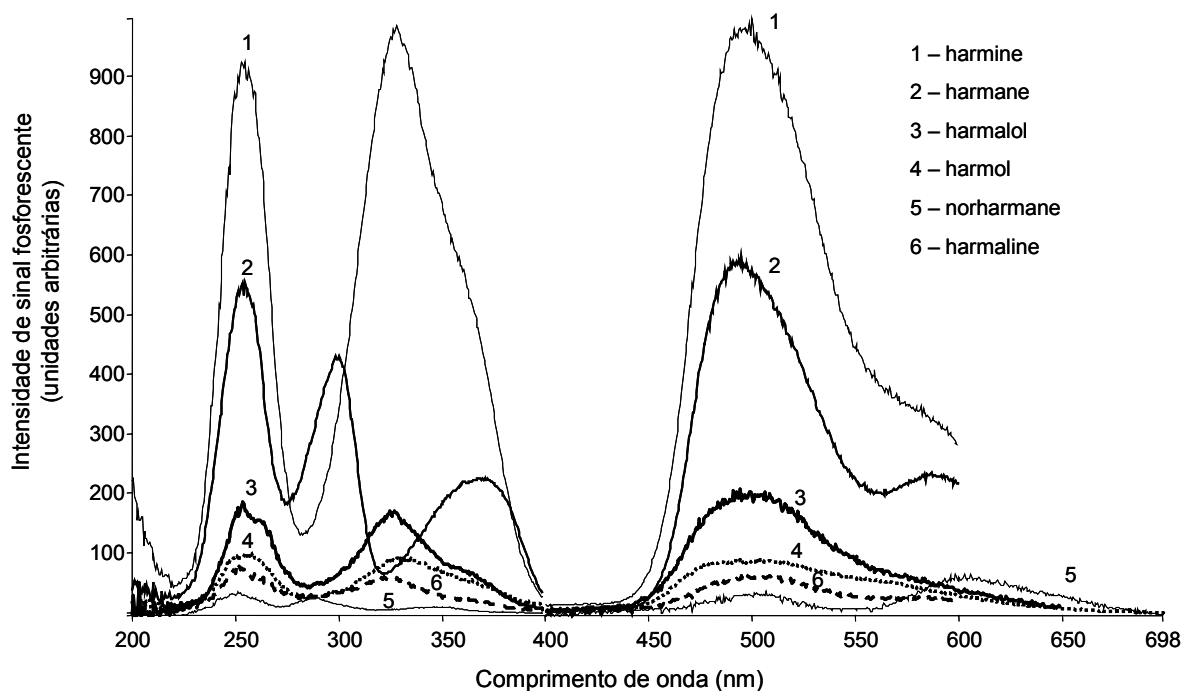


Figura 65: Sobreposição dos espectros de excitação e emissão fosforescentes dos seis derivados das β -carbólinas em pH original de suas soluções (2 nmol depositados no papel) e com o uso de TlNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (333 μg depositados no papel) como átomo pesado.

5.1.1.3

Efeito do SDS como modificador de superfície do substrato de celulose associado à variação de pH

O uso de surfactantes como modificadores de superfície do substrato de celulose também pode influenciar significativamente o sinal fosforescente dos analitos. As longas cadeias hidrocarbônicas do surfactante podem impedir a penetração das moléculas do analito e do átomo pesado nas camadas mais interiores do substrato de celulose, o que bloquearia a radiação de excitação¹²⁹. Paralelamente o surfactante pode aumentar o grau de imobilização da molécula fosforescente. Para verificar a possibilidade da ocorrência desse efeito, uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada no substrato de celulose previamente à adição da solução do analito. (vide esquema simplificado na Figura 66). Nesta etapa não foram usadas soluções de sais de átomos pesados. As médias das medições (em triplicata) de fosforescência podem ser vistos na Tabela 28. Para efeito de comparação, os resultados encontrados por Marques, FFC⁷³ para o harmane e o harmine também foram inseridos na mesma tabela.

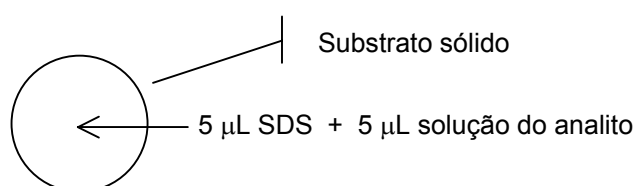


Figura 66: Esquema simplificado de adição das soluções de SDS e de analitos no substrato sólido.

Tabela 28: Efeito do surfactante, associado à influência do pH, no sinal fosforescente do harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane (2 nmol de suas soluções depositados no papel).

pH	$I_A - I_B$ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)					
	SDS + Harmane	SDS + Harmine	SDS + Harmol	SDS + Harmaline	SDS + Harmalol	SDS + Norharmane
Original	14 (250/500)	45 (251/501)	21 (250/495)	15 (250/500)	16 (250/510)	11 (254/511)
Ácido	0	25 (250/501)	38 (250/493)	27 (248/499)	35 (250/498)	26 (254/511)
Básico	0	0	0	17 (252/505)	17 (250/496)	12 (252/498)

Comparando-se os valores obtidos na Tabela 28 com os sinais observados sem a aplicação de SDS (Tabela 26), houve uma grande redução das intensidades emitidas nas três faixas de pH (principalmente para o harmine, o harmol e o norharmane) quando o SDS foi usado, o que nos leva a concluir que o uso do surfactante não foi favorável.

5.1.1.4

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

A presença de um surfactante também pode promover a aproximação efetiva entre molécula fosforescente e átomo pesado, o que pode incrementar o acoplamento spin-orbital entre as duas espécies, amplificando a fosforescência. Testes foram realizados utilizando o esquema simplificado mostrado na Figura 67, para verificar a influência do uso do SDS, associado à variação do pH na presença de diferentes íons de átomo pesado.

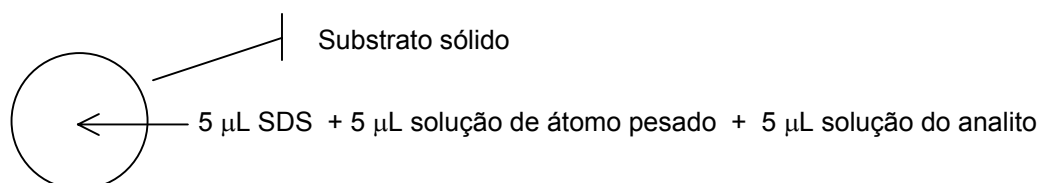


Figura 67: Esquema simplificado de adição das soluções de SDS, de átomos pesados e de analitos no substrato sólido.

Os resultados (médias das triplicatas) encontram-se na Tabela 29, Novamente, para efeito de comparação, os resultados encontrados (na pesquisa de mestrado) para o harmane e o harmine também foram inseridos na Tabela 4.

Tabela 29: Influência do agente surfactante, associado ao efeito do átomo pesado e do pH, no sinal fosforescente do harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane (2 nmol de suas soluções depositados no papel).

		Harmane					
		$I_A - I_B$ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)					
pH		SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original		70 (248/451)	206 (254/491)	0	0	0	15 (252/494)
Ácido		4 (250/503)	9 (249/498)	0	0	0	2 (249/501)
Básico		0	87 (284/594)	11 (250/597)	0	0	12 (302/461)
		Harmine					
		$I_A - I_B$ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)					
pH		SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original		31 (246/481)	278 (254/494)	33 (252/491)	0	21 (328/497)	15 (251/490)
Ácido		36 (334/500)	99 (252/501)	91 (255/497)	28 (331/498)	34 (331/496)	96 (252/497)
Básico		0	82 (300/596)	19 (250/597)	0	0	13 (243/494)
		Harmol					
		$I_A - I_B$ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)					
pH		SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original		53 (244/452)	17 (254/490)	10 (245/491)	44 (336/486)	11 (329/488)	18 (251/479)
Ácido		30 (335/488)	10 (249/491)	12 (328/489)	11 (335/491)	13 (332/492)	32 (250/492)
Básico		0	0	0	0	0	0

(continuação da Tabela 29)

Harmaline						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original	17 (250/496)	45 (254/505)	13 (255/507)	0	18 (328/505)	18 (250/503)
Ácido	23 (251/503)	14 (253/503)	15 (259/523)	0	8 (328/509)	38 (250/500)
Básico	0	14 (254/509)	17 (254/518)	0	0	18 (252/503)
Harmalol						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original	31 (248/494)	57 (255/507)	18 (255/511)	0	31 (328/505)	23 (250/506)
Ácido	26 (248/497)	10 (255/508)	15 (255/506)	0	14 (354/508)	50 (250/498)
Básico	0	14 (255/509)	16 (255/519)	0	0	20 (250/498)
Norharmane						
I_A-I_B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)						
pH	SDS + Ag ⁺	SDS + TI ⁺	SDS + I ⁻	SDS + Hg ²⁺	SDS + Pb ²⁺	SDS + Cd ²⁺
Original	65 (250/454)	19 (252/500)	20 (254/498)	0	9 (247/496)	17 (248/496)
Ácido	33 (251/501)	31 (251/500)	42 (254/507)	0	25 (305/503)	131 (253/503)
Básico	0	85 (289/605)	20 (259/527)	0	74 (290/610)	10 (252/501)

Como podemos ver na Tabela 29, mesmo com o uso de sais de átomos pesados, o surfactante também reduziu significativamente os sinais fosforescentes de todos os derivados da β -carbolina, principalmente naquelas condições ditas as mais significativas quando da análise dos resultados da Tabela 2.

Os resultados das Tabelas 26, 27, 28 e 29 indicam algumas condições de amplificação de sinal das β -carbolinas, porém esses mesmos resultados mostraram que as bandas espectrais de emissão e de excitação fosforescente dos seis derivados da β -carbolina são muito próximas em quase todas as situações estudadas, o que significa que a determinação sem a separação prévia dos mesmos teria que ser feita com outros recursos além da simples escolha do átomo pesado seletivo.

5.1.2

Estudos visando a determinação seletiva de β -carbolinas por SS RTP

A seletividade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de avaliar de forma inequívoca os analitos de interesse na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Essa característica, extremamente desejável nos métodos analíticos, permite a discriminação de sinais do analito na presença de seus metabólitos ou na presença de concomitantes de estruturas muito semelhantes.

A seletividade das técnicas baseadas na luminescência é decorrente de sua capacidade multidimensional, isto é, o processo luminescente contém uma grande quantidade de informações sobre o analito, que são baseadas não somente na intensidade e características espectrais de excitação e emissão, podendo ser também baseadas nas características temporais do fenômeno.⁸³ Artíficos instrumentais (varredura sincronizada, 2ª derivada e técnicas criogênicas) podem também ajudar na capacidade seletiva.¹¹¹ Como a simples escolha de átomo pesado não permitiria a determinação seletiva de uma β -carbolina na presença das outras, recursos instrumentais associados à escolha do átomo pesado foram utilizados para dois estudos de caso.

5.1.2.1

Estudo de caso I: Determinação seletiva de harmol em urina

Conforme discutido anteriormente, as β -carbolinas apresentam intensa fosforescência natural em substratos sólidos. Esta fosforescência natural é provavelmente favorecida pelos heteroátomos endocíclicos (nitrogênio) presentes na estrutura da molécula. Embora as intensidades de sinal sejam diferentes para cada β -carbolina estudada (harmol, harmane, harmine, norharmane, harmaline e harmalol), os comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{exc} = 250 e 336 nm) e emissão (λ_{em} = 486 nm) são iguais. No capítulo

1 deste trabalho já foi mencionado que o harmine constitui um dos principais metabólitos do harmane. E como mostra a rota metabólica na Figura 6, o harmol faz parte deste processo de biotransformação. Sabendo disto, foi feito um estudo da determinação seletiva de harmol na presença não só de harmane e de harmine, mas também de harmaline e norharmane.

Analisando mais detalhadamente os resultados da Tabela 27, verificou-se que o uso do Hg(II) provocou um aumento significativo de sinal do harmol enquanto provocou a diminuição de sinal de harmine e a eliminação do sinal do harmane. Os sinais do harmaline e do norharmane também são reduzidos nessa situação. Embora as bandas dessas composto estejam nas mesmas regiões do espectro, pensou-se que, se a quantidade de Hg(II) no substrato fosse corretamente ajustada, os sinais das outras β -carbolinas seriam eliminados enquanto que o sinal do harmol seria amplificado. Nesse caso, o ajuste da quantidade de Hg(II) promoveria a condição seletiva de trabalho.

Como a concentração máxima da solução de HgCl_2 foi $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (limitado pela solubilidade do sal), múltiplas adições de $5 \mu\text{L}$ foram usadas a fim de se obter quantidades maiores de HgCl_2 depositadas no substrato sólido e verificar o comportamento das β -carbolinas frente à variação de concentração deste átomo pesado. Conforme pode ser visto na Figura 68 foram feitas até cinco adições ($1,35 \text{ mg}$ of HgCl_2) com posterior secagem dos substratos em dessecador à vácuo por 2 horas. Os melhores resultados foram encontrados com três adições de HgCl_2 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,81 \text{ mg}$) no substrato sólido, que ocasionou aumento no qual o sinal fosforescente do harmol em quase sete vezes, comparado ao substrato contendo somente o analito (harmol), e a quase total eliminação dos sinais de harmane, harmaline e norharmane. Para o harmine, a magnitude do sinal permaneceu quase constante, porém bem menos intensa que a do harmol, na faixa que vai de $0,27 \text{ mg}$ a $1,35 \text{ mg}$ de HgCl_2 . Espectros de emissão fosforescentes que ilustram este comportamento podem ser vistos na Figura 69.

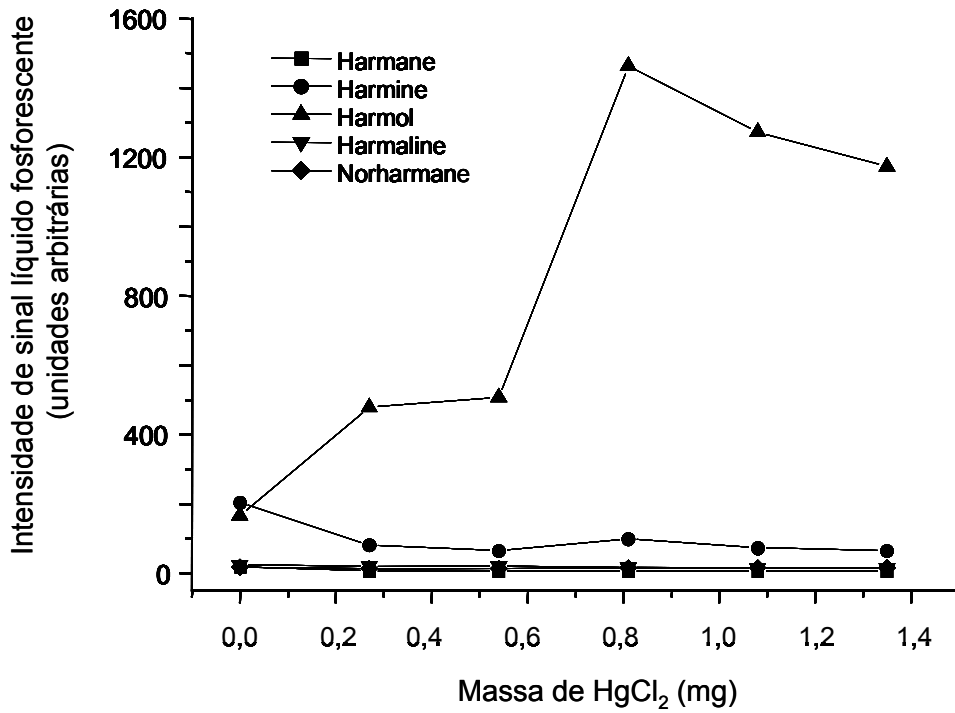


Figura 68: Efeito da quantidade de HgCl₂ no sinal fosforescente das β-carbolinas (2nmol de suas soluções em pH original depositados no papel), utilizando 0,81 mg de HgCl₂ como átomo pesado depositado no substrato de celulose.

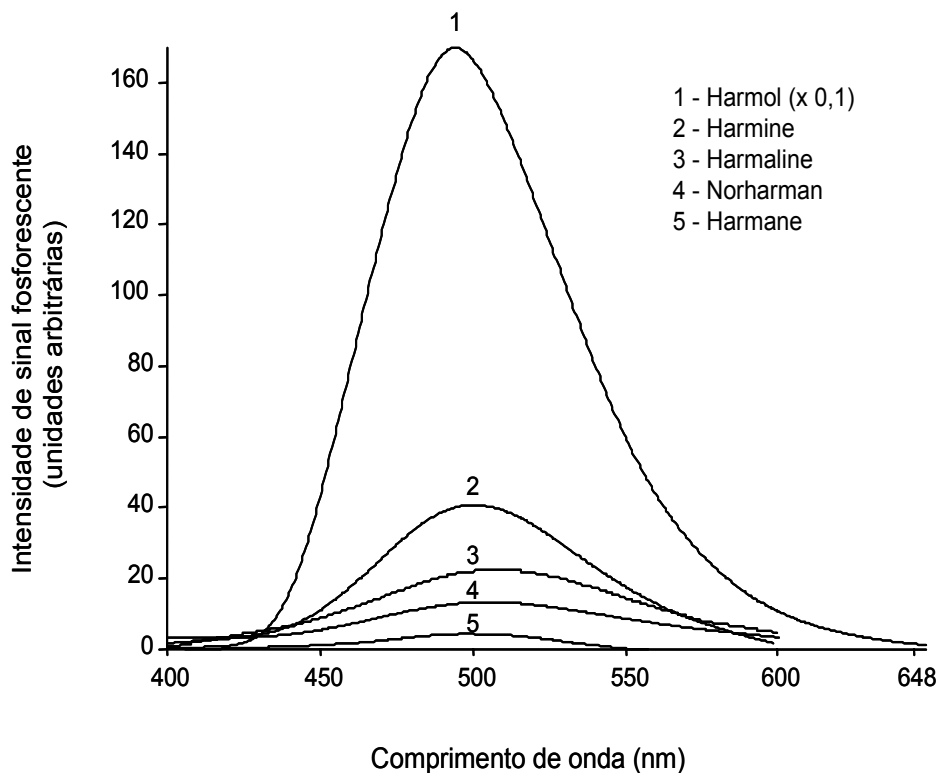


Figura 69: Espectros de emissão fosforescente das β-carbolinas (2 nmol de suas soluções em pH original depositados no papel), utilizando 0,81 mg de HgCl₂ como átomo pesado depositado no substrato de celulose.

Embora relativamente pequenas quando comparadas com o sinal do harmol, as bandas de fosforescência das outras β -carbolinas (principalmente a do harmine) poderiam causar interferência espectral na determinação de harmol se eles estiverem presentes em quantidades significativas nas amostras. Por esta razão, a técnica da derivação de segunda ordem foi aplicada a fim explorar a pequena diferença entre o λ_{em} (486 nm) do harmol em contraste com o λ_{em} (498 nm) observado para as outras β -carbolinas. Em tal caso, pontos isodiferenciais (λ_{iso}) foram identificados, permitindo a medida do sinal do harmol em uma região onde os sinais dos outros compostos estavam mais próximos da linha de base. Estes λ_{iso} foram identificados pela comparação do perfil fosforescente (Figura 70) e dos testes de interferência usando misturas sintéticas de β -carbolinas (Tabela 30 e Tabela 31).

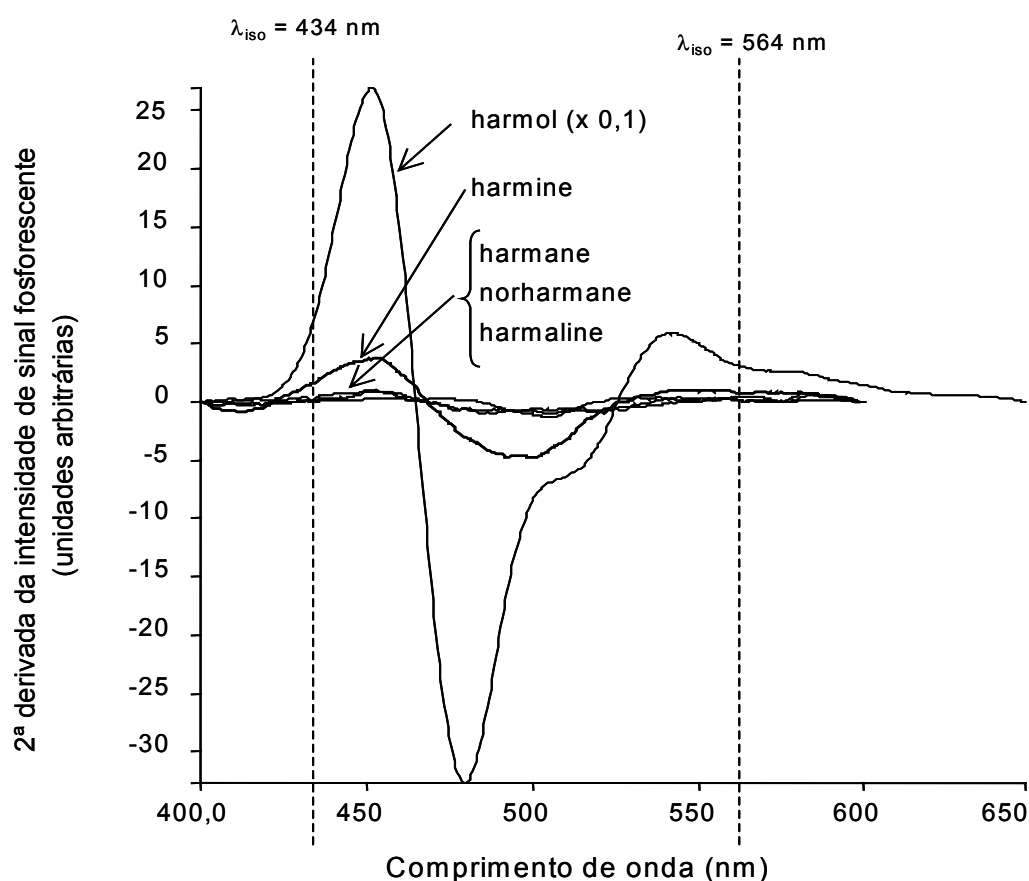


Figura 70: Espectros de 2ª derivada da SS RTP das β -carbolinas (2 nmol de suas soluções em pH original depositados no papel) na presença de 0,81 mg of $HgCl_2$.

Tabela 30: Estudos de interferência na fosforescência do harmol

pH original / 0,60 mg Hg(II)	
Razão molar (harmol:harmine)	$I_{(\text{harmol} + \text{harmine})} / I_{(\text{harmol})}$
1:1	$0,99 \pm 0,10$ (564 nm)
1:10	$0,89 \pm 0,12$ (564 nm)
1:50	$1,42 \pm 0,15$ (564 nm)
Razão molar (harmol:harmane)	$I_{(\text{harmol} + \text{harmane})} / I_{(\text{harmol})}$
1:1	$1,20 \pm 0,23$ (434 nm)
1:10	$0,97 \pm 0,17$ (434 nm)
1:50	$1,35 \pm 0,27$ (434 nm)
Razão molar (harmol:harmine:harmane)	$I_{(\text{harmol} + \text{harmine} + \text{harmane})} / I_{(\text{harmol})}$
1:1:1	$0,92 \pm 0,10$ (564 nm)
1:10:10	$1,12 \pm 0,16$ (564 nm)
1:50:50	$1,58 \pm 0,21$ (564 nm)

Tabela 31. Determinação de harmol (2 nmol) através da 2ª derivada do espectro de RTP usando Hg(II) e considerando 564 nm como ponto isodiferencial.

Composição da mistura de β -carbolinas (proporção relativa em mol L ⁻¹)	$I_{\text{harmol na mistura}} / I_{\text{harmol}}$
harmol:harmine:harmane:harmaline:norharmane (1:1:1:1:1)	$0,92 \pm 0,10$
harmol:harmine:harmane:harmaline:norharmane (1:10:10:10:10)	$1,12 \pm 0,16$

$I_{\text{harmol na mistura}} / I_{\text{harmol}}$: Razão entre a medida de RTP do harmol (2 nmol) contido em uma mistura de β -carbolinas e a medida de RTP de uma solução padrão de harmol 2 nmol.

Na presença de harmane, norharmane ou harmaline o λ_{iso} em 434 nm foi escolhido por permitir a medição de um bom sinal fosforescente para o harmol. Para misturas contendo também o harmine, o valor λ_{iso} mais indicado foi de 564 nm, onde a fosforescência do padrão do harmol é estatisticamente similar ao medido nas misturas contendo as outras quatro β -carbolinas em quantidades dez vezes maiores que o harmol (como mostrado nos testes de interferência detalhados a seguir).

Utilizando a condição seletiva adotada (soluções dos analitos em pH original e 0,81 mg de HgCl_2 depositados no substrato sólido), foram feitas varreduras em 2ª derivada das misturas harmol:harmine e harmol:harmane nas proporções molares de 1:1; 1:10 e 1:50 e também de harmol:harmine:harmane 1:1:1; 1:10:10 e 1:50:50. Os resultados encontrados para as razões $I_{(\text{mistura})} / I_{(\text{harmol})}$ são mostradas na Tabela 30, para os quais os comprimentos de onda isodiferenciais (λ_{iso}) considerados foram: (i) 564 nm para a determinação de harmol na presença de harmine; (ii) 434 nm para a determinação de harmol na presença de harmane e (iii) 564 nm para a determinação de harmol na presença de ambos (harmine e harmane). Razões com valores de 0,89 a 1,20 indicam que não houve interferência significativa do harmine ou harmane na medida do sinal fosforescente do harmol. Razões com valores significativamente mais altos do que 1, implicaram em interferência espectral sobre o sinal do harmol. Os resultados da Tabela 30 mostraram que não foram encontradas interferências na fosforescência do harmol em misturas contendo até 10 vezes mais harmine (harmol:harmine, 1:10). No entanto, interferência espectral na mistura harmol:harmine 1:50 é apontada pelo valor $I_{(\text{harmol} + \text{harmine})} / I_{(\text{harmol})}$ igual a 1,42. Já no caso das misturas que continham harmane, enquanto houve contribuição praticamente nula deste analito no sinal do harmol em misturas contendo concentrações com até dez vezes mais do interferente (harmol:harmane, 1:10), para as proporções 1:50 v/v houve interferência espectral no sinal do harmol ($I_{(\text{harmol} + \text{harmane})} / I_{(\text{harmol})} = 1,35$). Para as misturas do três analitos na proporção de 1:10:10 para harmol:harmine:harmane, não foi encontrada interferência espectral dos interferentes no sinal do harmol ($I_{(\text{harmol} + \text{harmine} + \text{harmane})} / I_{(\text{harmol})} = 1,12$). No entanto, quando a proporção foi de 1:50:50 o valor de 1,58 obtido para a razão $I_{(\text{harmol} + \text{harmine} + \text{harmane})} / I_{(\text{harmol})}$ indicou a presença de interferência espectral neste caso. Um resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação fosforimétrica do harmol em misturas com harmine e/ou harmane é mostrado na Tabela 32.

Os mesmos testes de interferência foram feitos com o harmol na presença de harmaline e norharmane e os resultados foram similares àqueles observados com misturas harmol:harmine:harmane.

Para novos estudos de interferência (utilizando a mesma condição seletiva: soluções dos analitos em pH original e 0,81 mg de HgCl_2 depositados no papel), uma única mistura dos cinco derivados das β -carbolinas em estudo foi feita nas proporções molares de 1:1:1:1:1 e 1:10:10:10:10 de harmol:harmine:harmane:harmaline:norharmane. Foram realizadas varreduras em 2ª derivada destas misturas, nas quais o comprimento de onda isodiferencial (λ_{iso}) considerado foi de 564 nm. As razões $I_{(\text{harmol na mistura})} / I_{(\text{harmol})}$ são mostradas na Tabela 31 e os valores de 0,92 a 1,12 indicaram que não houve interferência significativa do harmine, harmane, norharmane e harmaline em misturas contendo até 10 vezes mais interferente (1:10:10:10:10).

O harmalol não foi considerado nesta mistura porque certamente seria um relevante interferente no sinal do harmol, visto que seus comprimentos de onda de excitação e emissão fosforescentes são exatamente iguais ao do harmol (Tabela 27).

Tabela 32: Resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação fosforimétrica do harmol em misturas com harmine:harmane:harmaline:norharmane

Interferentes	harmine:harmane:harmaline:norharmane
harmol:interferentes	1:10:10:10:10
Solvente	MeOH: água ultrapurificada 1:3 v/v
pH da solução dos analitos	original
Sal de átomo pesado	HgCl_2 (0,81 mg)*
λ_{iso} (nm)	564
Tipo de varredura	2ª derivação do espectro de emissão

*massa efetiva de sal do átomo pesado depositada no substrato de celulose

5.1.2.1.1

Condições experimentais para a determinação seletiva de harmol usando um método de referência adaptado baseado em cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A avaliação do método SS RTP seletivo proposto para determinação de harmol foi comparado com o resultado obtido com um método já reportado na literatura. Esse método escolhido foi o baseado na cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) desenvolvido por Cheng and Mitchelson⁶³. Esses autores descreveram condições experimentais para a separação por MECK e determinação fotométrica de seis β -carbolinas usando o surfactante aniônico SDS como fase pseudo-estacionária. Em seu trabalho, o tampão de borato (pH 9,0) foi usado em meio contendo 15% de acetonitrila em volume e ureia como modificador orgânico. No presente trabalho, foram feitas adaptações destas condições (descritas no item 3.4.4) a fim de melhorar a eficiência da separação das β -carbolinas, pois as condições reportadas implicaram em condições não robustas para a separação com variações no tempo de migração e na área dos picos dos analitos. Além disso, foi verificado que a quebra das pontas do capilar se tornou muito frequente por causa da deposição do modificador químico ureia, requerendo reposição do capilar e limpeza do sistema. Nas condições experimentais adaptadas neste trabalho, o uso da ureia foi eliminado e dois procedimentos de condicionamento foram aplicados: um mais rápido entre as corridas e um maior, aplicado de tempos em tempos a fim de melhorar a eficiência da separação e minimizar a dispersão dos picos. Nestas condições, a separação foi feita em um tempo de migração de 21 min (Figura 71).

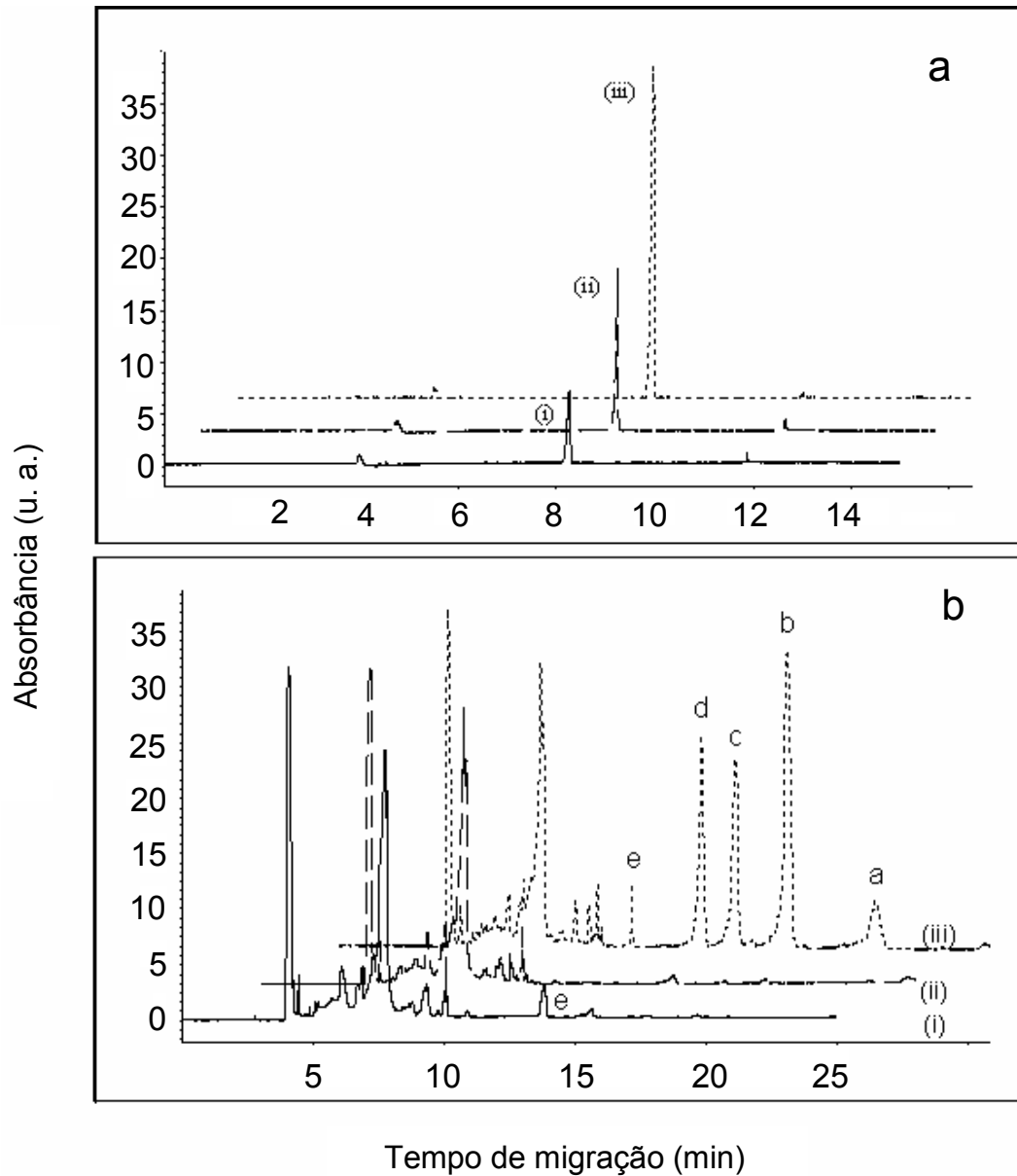


Figura 71: (a) Eletroferogramas de uma sequência de padrões de harmol ($t_m = 8,25$ min): (i) 1×10^{-5} , (ii) 2×10^{-5} e (iii) 5×10^{-5} mol L⁻¹; (b) Eletroferogramas de (i) harmol (1×10^{-5} mol L⁻¹) em urina, (ii) urina e (iii) urina contendo: a) harmaline (1×10^{-4} mol L⁻¹; $t_m = 20,5$ min), b) harmine (1×10^{-4} mol L⁻¹; $t_m = 17,1$ min), c) harmane (1×10^{-4} mol L⁻¹; $t_m = 15,1$ min), d) norharmane (1×10^{-4} mol L⁻¹; $t_m = 13,8$ min) e e) harmol (1×10^{-5} mol L⁻¹; $t_m = 11,2$ min).

A Figura 71 mostra a capacidade do método por MEKC adaptado para determinação seletiva de harmol não só na presença de harmane e de harmine

(como sugere a rota metabólica mostrada na Figura 6), mas também na presença de harmaline e norharmane.

5.1.2.1.2

Parâmetros analíticos de mérito para a determinação de harmol através dos métodos SS RTP e MEKC adaptado

Parâmetros analíticos de mérito referentes ao método desenvolvido por SS RTP e ao método MEKC adaptado foram estimados e listados na Tabela 33. Essa comparação foi feita de modo a se ter uma real avaliação de desempenho da técnica SS RTP com outra técnica analítica. Três curvas analíticas foram construídas usando padrões de harmol (de 1×10^{-6} a 5×10^{-5} mol L⁻¹) e o sinal analítico plotado em função da concentração (mol L⁻¹) da solução padrão injetada no capilar ou depositada no substrato sólido. A melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada com ajuda do programa Origin 6.0.

Para o harmol nas condições otimizadas para a sua determinação na presença de harmine, harmane, harmaline e norharmane em concentrações até 10 vezes maiores (Tabela 32), verifica-se uma faixa linear ($r^2 = 0,9937$ para as determinações por SS RTP e $r^2 = 0,9999$ para as determinações por MEKC) que se estendeu até a concentração de 1×10^{-6} mol L⁻¹ para ambos os métodos (Figura 72 e Figura 73). A homoscedastidade do método SS RTP é indicado pelo gráfico de resíduos da Figura 74.

A precisão das medições foi avaliada pela repetitividade (parâmetro que avalia o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas em uma mesma amostra sob as mesmas condições)^{80,81}, a qual foi estimada pelo desvio padrão de medições consecutivas do sinal de uma solução padrão de harmol 1×10^{-5} mol L⁻¹ (11,7 ng de harmol depositado no substrato sólido). A repetitividade foi de 2,5% (n=10) para SS RTP e 4,2% (n=5) para MEKC. As detectabilidades destes métodos foram calculadas em função da concentração da solução de harmol ou da quantidade de harmol que provocou um sinal analítico três vezes maior que o sinal do branco. Em outras palavras, este parâmetro indicou a quantidade mínima de harmol que pôde ser efetivamente detectada pelos respectivos métodos. Para SS RTP este valor foi $5,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ou 0,59 ng de harmol. Para MEKC este valor foi de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

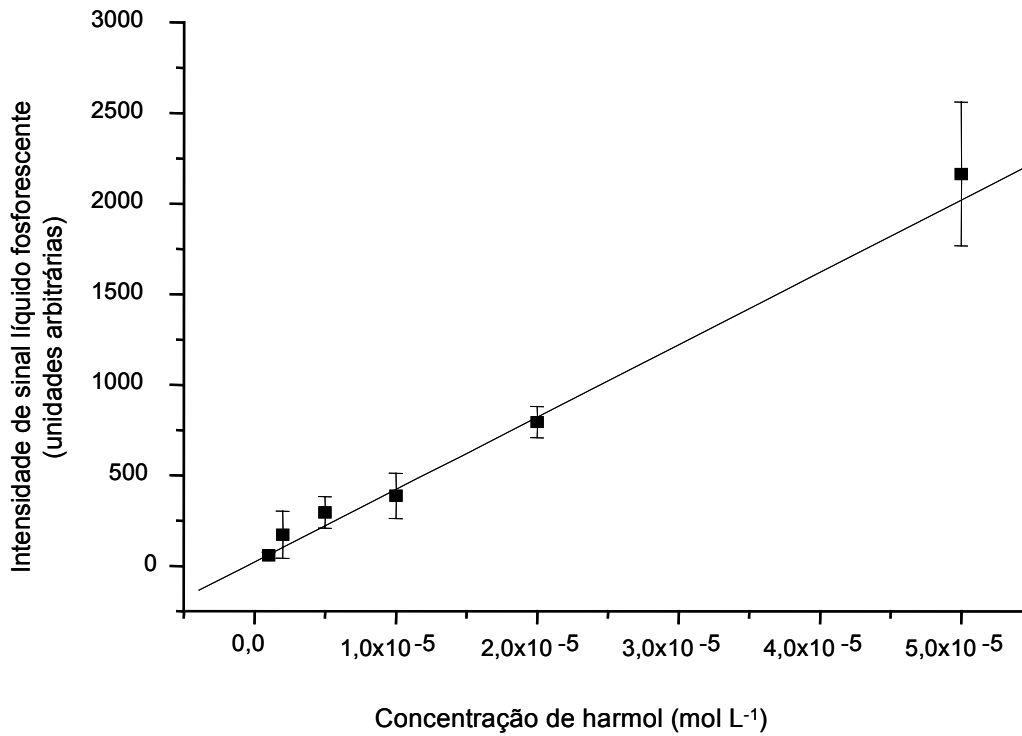


Figura 72: Curvas analíticas para o harmol, feita por SS RTP, obedecendo as condições para determinação seletiva (Tabela 32).

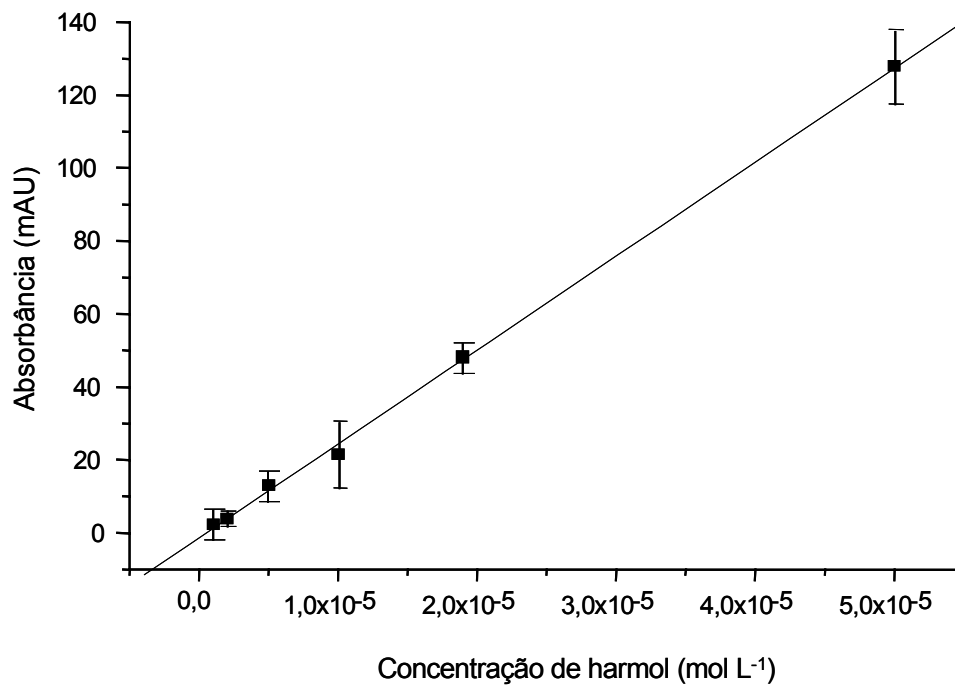


Figura 73: Curvas analíticas para o harmol, feita por MEKC, obedecendo as condições para determinação seletiva (Tabela 32).

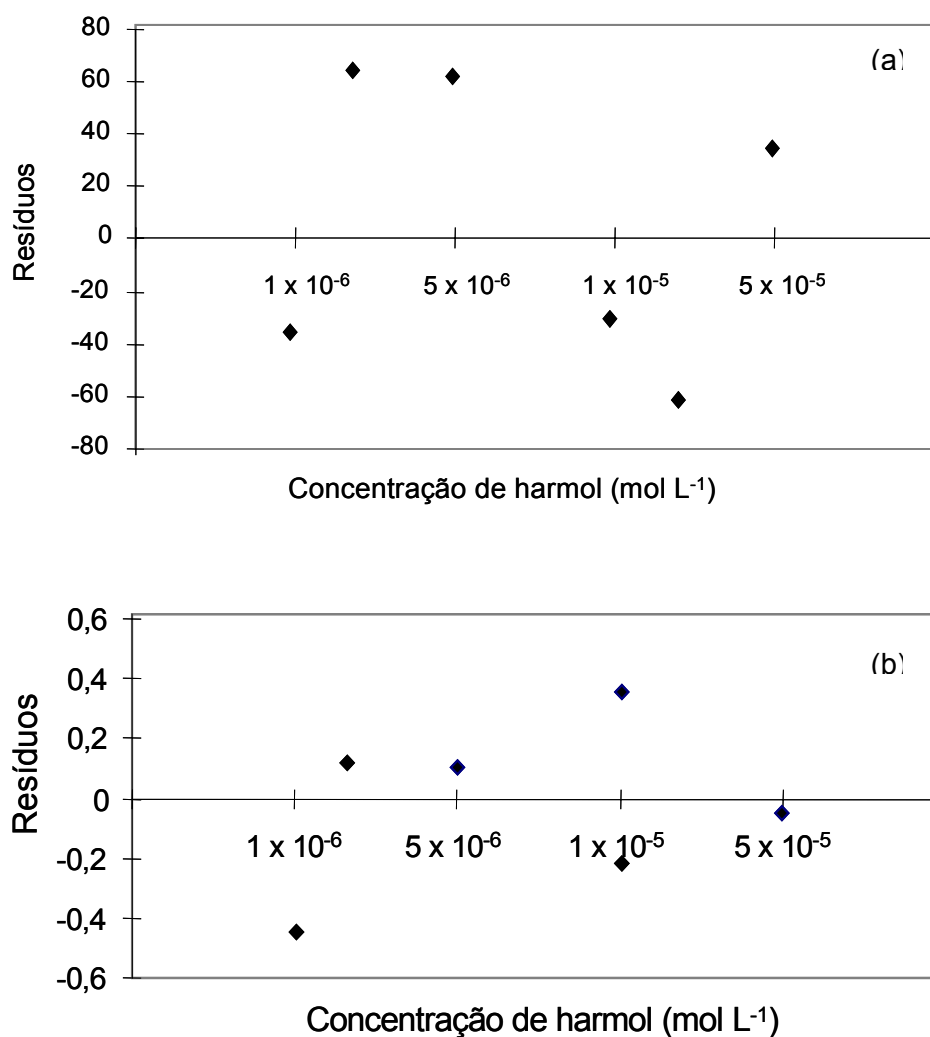


Figura 74: Gráficos de resíduos para a determinação de harmol por (a) SS RTP e por (b) MEKC (método de validação).

Tabela 33: Parâmetros analíticos para a determinação seletiva de harmol usando SS RTP e MEKC.

	SS RTP	MEKC
Condições da medição	$\lambda_{\text{iso}}=564 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}}=336 \text{ nm}$) 0,81 mg de HgCl ₂	$\lambda_{\text{abs}}=254 \text{ nm}$ e $t_m=21 \text{ min}$
Equação da curva	$y = 3,99 \times 10^7 X + 21,71$	$y = 2,57 \times 10^{-6} X - 1,44$
r^2	0,9937	0,9999
Repetitividade a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (número de replicatas)	2,5 % (n = 10)	4,2% (n = 5)
Detectabilidade ^a	$5,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (0,59 ng em valor absoluto)	$5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

^a Menor concentração ou massa de harmol que produz sinal analítico equivalente a três vezes o sinal do branco

5.1.2.1.3

Testes de recuperação em amostras de urina usando SS RTP e MEKC adaptado

Os métodos foram testados usando amostras de urina fortificadas com o analito de interesse (harmol) e com duas β -carbolinas consideradas como interferentes principais (harmane e harmine) por causa da rota metabólica que ocorre no fígado Figura 6. Previamente, testes em amostras de urina não fortificadas (vide procedimento de *clean up* no item 3.2.1) não indicaram nenhum sinal de matriz quando foram usadas as condições otimizadas para as determinações de harmol por SS RTP. Para amostras contendo harmol ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), harmane ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e harmine ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), o percentual médio de recuperação para o harmol foi de $100 \pm 12\%$ ($n = 3$) para SS RTP e $91 \pm 2\%$ ($n = 3$) para MEKC¹³⁰.

Estes resultados indicaram a possibilidade do método SS RTP para tal aplicação. Um teste estatístico (teste t de Student) indicou que não houve diferença entre os resultados encontrados pelos dois métodos ($t_{\text{calculado}}=0,64 < t_{\text{crítico}} = 2,23$ para $p=0,05$; $n_{\text{SS RTP}} = 4$; $n_{\text{MEKC}} = 3$). Logo, a hipótese nula de que os dois métodos não diferem não é rejeitada. Esses resultados são resumidos na Tabela 8.

Tabela 34: Taxa de recuperação do harmol $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de harmine ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e de harmane ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em amostras de urina

	Taxa de Recuperação ($n = 3$)
Método fosforimétrico proposto (SS RTP)	100 ± 12
Método de referência adaptado (MEKC)	91 ± 2

Este estudo de caso visando a determinação seletiva de harmol em urina por SS RTP foi publicado, conforme referência 130.

5.1.2.2

Estudo de caso II: Determinação seletiva de harmane na presença de harmine em chás

Conforme comentado no Capítulo 1, os alcaloides indólicos podem ocorrer em diversas plantas e, devido à sua importância toxicológica, foi de interesse o desenvolvimento de um método analítico baseado na SS RTP para a determinação de harmane na presença de harmine em chás. No entanto, a seleção de condições para a determinação de harmane na presença de harmine, foi uma tarefa que se mostrou bastante difícil, pois através dos estudos das características fosforescentes destes analitos (Tabela 26, Tabela 27, Tabela 28 e Tabela 29) não se pode identificar claramente uma condição experimental onde o sinal do harmane seja observado na ausência de sinal do harmine. Esse fato reflete o grau de complexidade de se realizar análises seletivas para as β -carbolinas.

5.1.2.2.1

Condições experimentais para a determinação de harmane na presença de harmine

Diante da dificuldade para identificar claramente uma condição experimental onde o sinal do harmane fosse detectado na ausência de sinal do harmine, fez-se uma tentativa levando em consideração a pequena variação da posição dos picos de excitação de harmane ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 248/455$ nm) em relação ao do harmine ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 336/451$ nm) quando ambos são preparados em pH original de suas soluções e colocados no substrato na presença de 8,5 μ g de $AgNO_3$ (Tabela 27). A Figura 75 mostra um estudo feito por Marques, FFC³⁴ sobre a influência da massa de $AgNO_3$ depositada no substrato de celulose no sinal destes dois analitos, comprovando que quando a massa de $AgNO_3$ depositada no papel é de 8,5 μ g, o sinal do harmane é máximo e que para massas maiores, o sinal vai decrescendo por causa do escurecimento do papel (que causa um efeito-filtro) provocado pela oxidação da prata durante as duas horas de permanência do substrato no dessecador.

Como pode ser visto na Figura 76, em 292 nm há um máximo de excitação para o harmane e ao mesmo tempo um mínimo de sinal para o harmine. No entanto, como este sinal do harmine em 292 nm ainda pode interferir no sinal fosforescente do harmane no caso daquele estar presente em proporções maiores nas misturas, foram feitas varreduras sincronizadas de fosforescência

das soluções (harmane $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e mistura harmane $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$:harmine $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) usando $\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$ (diferença entre o $\lambda_{\text{exc}} = 346 \text{ nm}$ e o $\lambda_{\text{em}} = 455$). Os espectros destas varreduras encontram-se na Figura 77, com interferência espectral nítida. Para tentar viabilizar a determinação seletiva do harmane através do aumento da capacidade de discriminação, foram construídos espectros de fosforescência derivada superior da varredura sincronizada. Os valores de fosforescência (em unidades arbitrárias) foram lidos no comprimento de onda isodiferencial (λ_{iso}) igual a 322 nm, onde o sinal do harmine é praticamente nulo (Figura 78). Além disso, um estudo de pH feito durante o meu trabalho de mestrado¹⁴⁴ mostrou que para o harmane o aumento de sinal acontece até o pH em torno de 11, mantendo-se estável até o pH = 12, de onde provavelmente, de acordo com o indicado nos estudos preliminares (Tabela 27), diminuiria em meio extremamente básico. Logo, o uso de tampão Britton-Robinson (pH=11) foi um outro parâmetro também importante para aumentar a seletividade do harmane frente ao harmine. Ao selecionar tais condições (Tabela 35), prosseguiu-se com as avaliações de interferência.

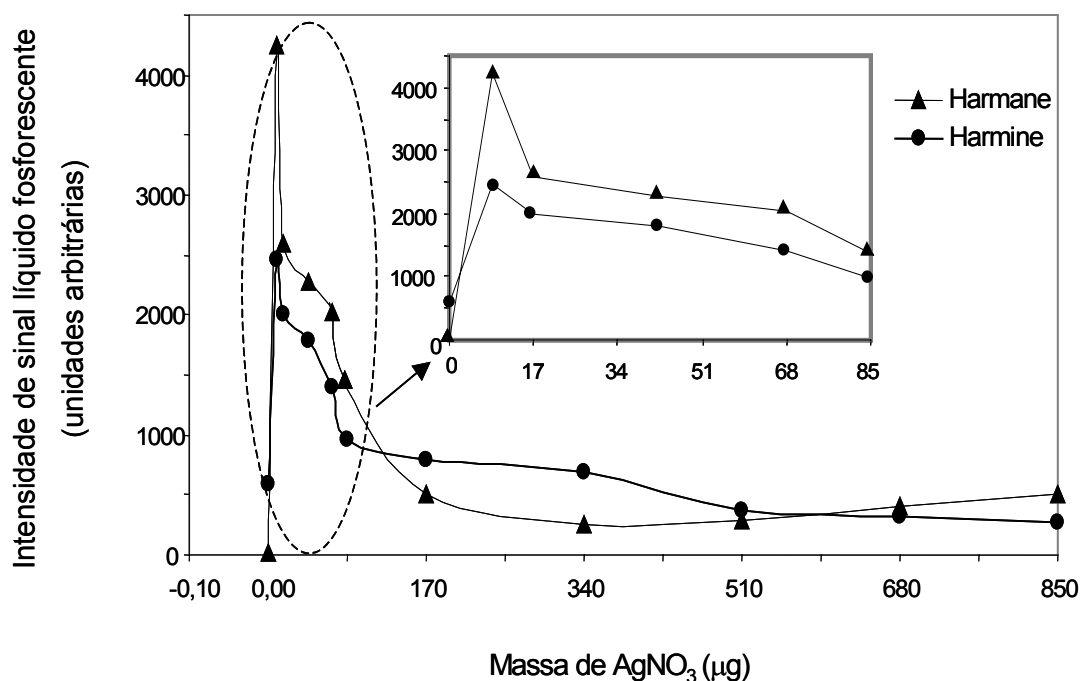


Figura 75: Influência da massa de AgNO₃ depositada no substrato de celulose, no sinal fosforescente do harmane $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2 nmol) e do harmine $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2 nmol), em pH natural, sem SDS e sem tratamento fotoquímico.

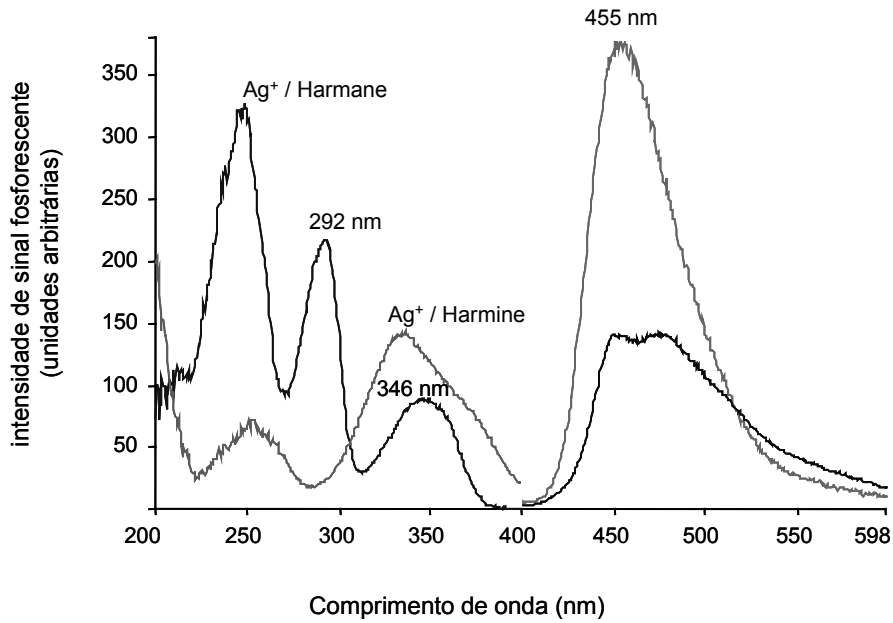


Figura 76: Sobreposição dos espectros do harmane e do harmine em pH original na presença de AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($8,5 \mu\text{g}$ depositados no papel), utilizando varredura normal.

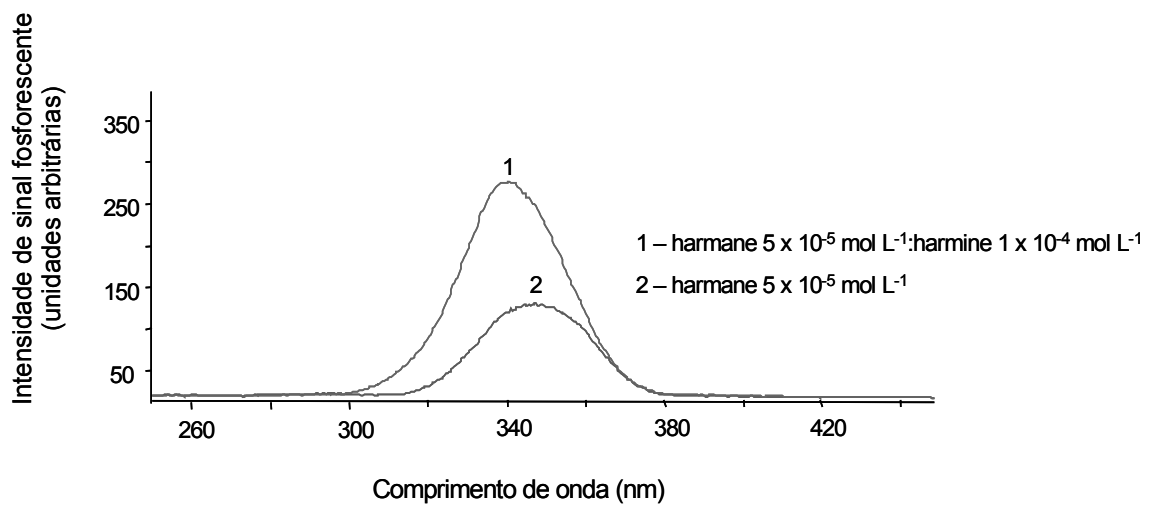


Figura 77: Espectros das varreduras sincronizadas da fosforescência em $\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$ e $\lambda = 346 \text{ nm}$ e utilizando AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($8,5 \mu\text{g}$ depositados no papel).

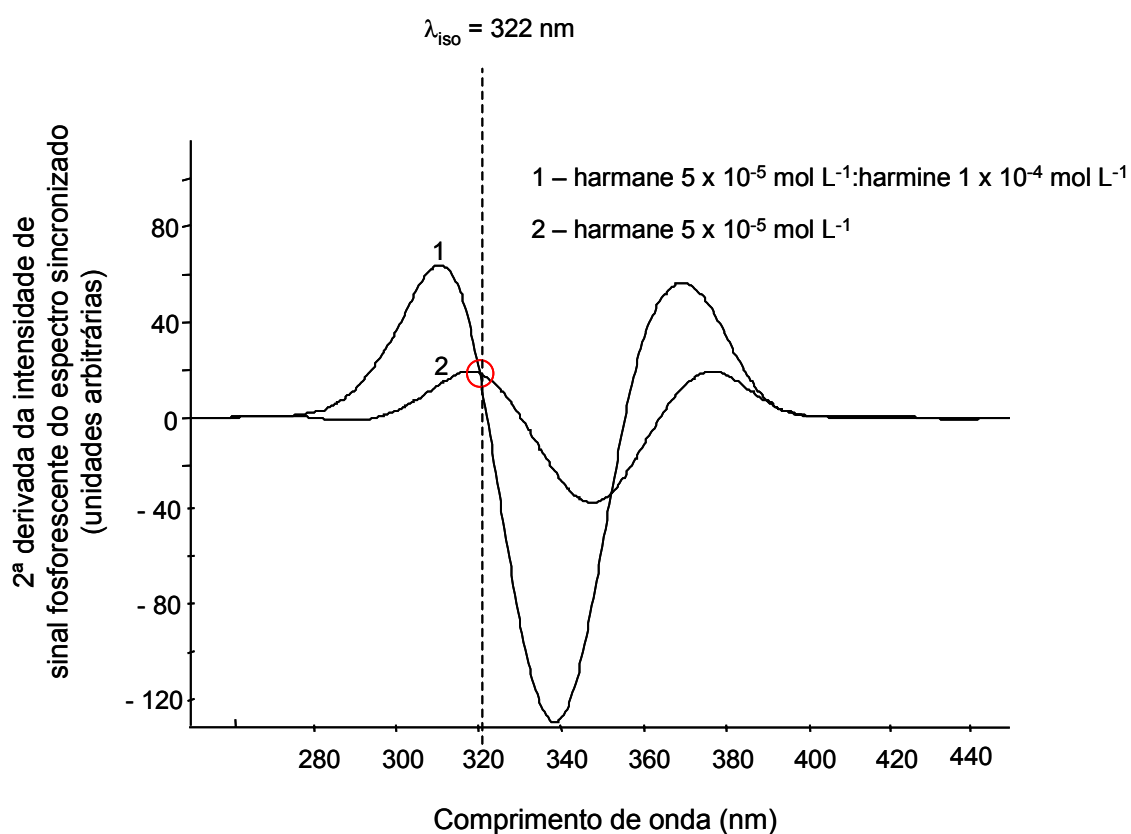


Figura 78: Espectros da 2ª derivada das varreduras sincronizadas da Figura 77.

Tabela 35: Resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação fosforimétrica do harmone na presença de harmine.

Condições experimentais	
Solvente	MeOH: água ultrapurificada 1:3 v/v
pH da solução dos analitos	11 (tampão Britton-Robinson)
Sal de átomo pesado	AgNO ₃ (8,5 µg)
λ_{iso} (nm)	322
Tipo de varredura	2ª derivada da varredura sincronizada ($\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$)

5.1.2.2.2 Avaliação de interferências

5.1.2.2.2.1 Interferências do harmine na intensidade do sinal fosforescente do harmane

Nos estudos de interferência para avaliar a influência do harmine na fosforescência do harmane, soluções de harmane $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram feitas com misturas contendo diferentes proporções de harmine.

Utilizando a condição seletiva adotada (Tabela 35), foram realizadas varreduras sincronizadas ($\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$) seguidas de 2ª derivação (medição em $\lambda_{\text{iso}} = 322 \text{ nm}$) das misturas harmane:harmine nas proporções molares de 1:1; 1:2 e 1:5.

Os resultados encontrados para as razões $I_{(\text{harmane+harmine})} / I_{(\text{harmane})}$ são mostradas na Tabela 36, na qual as razões com valores de 1,07 e 1,13 indicaram que não houve interferência significativa do harmine na medida do sinal fosforescente do harmane. A razão com valor de 1,98 (significativamente mais alto do que 1), implica em interferência espectral sobre o sinal do harmane. Logo, os resultados da Tabela 36 mostraram que não foram encontradas interferências na fosforescência do harmane em misturas contendo até duas vezes mais harmine (harmane:harmine, 1:2), o que indica a dificuldade da determinação seletiva de harmane na presença de outras β -carbolinas.

Tabela 36: Estudos de interferência do sinal fosforescente do harmine no sinal do harmane usando as condições estabelecidas na Tabela 35.

Razão molar (harmane:harmine)	$I_{(\text{harmane+harmine})} / I_{(\text{harmane})}$
1:1	$1,07 \pm 0,11$
1:2	$1,13 \pm 0,15$
1:5	$1,98 \pm 0,27$

5.1.2.2.2.2 Interferência da matriz de chá na medição do sinal fosforescente do harmane

Como o foco desta parte do trabalho está na determinação de harmane em chás, testes foram feitos para verificar a possibilidade ou não de interferência do próprio chá no sinal do harmane.

Três tipos de chás foram selecionados: camomila, capim cidreira e erva-doce. A massa de 1 g de cada chá foi aquecido em metanol:água ultrapurificada (1:3 v/v) por 15 min e uma alíquota de 2,5 mL foi separada e fortificada com solução padrão de harmane ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) a fim de se obter amostras contendo 5×10^{-6} e $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como concentrações finais deste analito. O extrato do chá fortificado foi misturado com 7,5 mL de tampão Britton-Robinson (pH=11). Os sinais fosforescentes de cada solução (em triplicatas), assim como de seus respectivos brancos, foram lidos utilizando AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($8,5 \mu\text{g}$ depositados no papel) como solução de átomo pesado e varreduras normais feitas em $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 248/450 \text{ nm}$, (neste caso não foi necessário o uso da varredura sincronizada e da segunda derivação porque somente com a varredura normal já foi possível verificar se haveria ou não interferência do chá no sinal do harmane).

Com este experimento foi verificado que não há interferência dos chás no sinal do harmane (Figura 79).

No entanto, a fim de refinar mais este estudo foi necessário saber qual a quantidade ideal de chá na mistura para que não ocorra interferência. Para isto preparou-se soluções contendo harmane na concentração final de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tampão Britton-Robinson (pH = 11), solvente metanol:água (1:3 v/v) e diferentes quantidades de chá (infusão de 1g de camomila, erva-doce e capim cidreira com 30 mL de MeOH:água ultrapurificada 1:3 v/v). Um resumo destas soluções, assim como das razões obtidas entre a intensidade da mistura contendo o chá fortificado e a mistura contendo somente o analito de interesse encontra-se na Tabela 37. Neste estudo foram usadas as condições otimizadas (Tabela 35) de forma que os sinais fosforescentes de cada solução (em triplicatas), assim como de seus respectivos brancos, foram medidos utilizando AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($8,5 \mu\text{g}$ depositados no papel) como átomo pesado e as varreduras sincronizadas foram feitas com $\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$ e $\lambda = 346 \text{ nm}$.

Na Tabela 37 as razões com valores de 0,50 e 0,71 indicam que o chá está interferindo no sinal fosforescente do harmane, enquanto que os valores de 0,99 apontam a não interferência do chá se usado na proporção adequada na mistura. Logo, a mistura contendo harmane:tampão:solvente:chá 1:1:4:4 foi escolhida como a melhor para ser usada nos testes de recuperação.

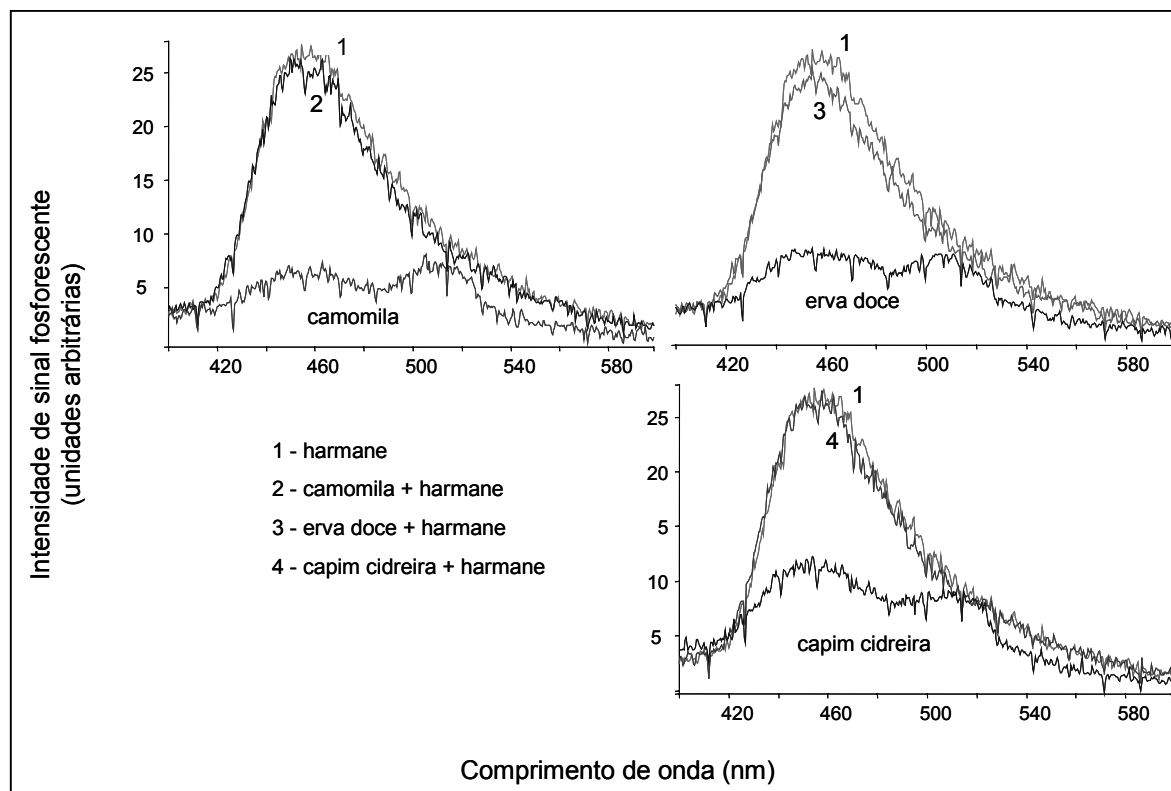


Figura 79: Espectros de emissão fosforescente de solução de padrão de harmane ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); solução de chá fortificado com harmane $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; extrato do chá (branco).

Tabela 37: Soluções para o estudo da interferência do chá no sinal do harmane

Proporções ^a	Harmane ^b (mL)	Tampão Britton Robinson ^c (mL)	MeOH:água 1:3 v/v (mL)	Extrato de chá (mL)	$I_{\text{chá fortificado}}/I_{\text{padrão}}^e$
Padrão	1	1	8	0	----
2:8	1	1	0	8	0,50
4:6	1	1	2	6	0,71
6:4	1	1	4	4	0,99
8:2	1	1	6	2	0,99

a. Proporção (harmane + tampão + solvente):chá

b. Concentração final de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

c. Tampão com pH 11

d. Extrato de chá preparado em MeOH:água ultrapurificada 1:3 v/v

e. Razão entre a intensidade fosforescente da mistura contendo o chá fortificado com harmane e a mistura contendo somente o analito de interesse na mesma concentração presente no chá.

5.1.2.2.3

Determinação de harmane na presença de harmine em chás

Utilizando as proporções pré-estabelecidas (harmane: tampão: solvente:chá 1:1:4:4 v/v) no item anterior, preparou-se uma solução contendo 4,0 mL de chá de camomila (após infusão de 1 g em 30 mL de MeOH:água ultrapurificada 1:3 v/v e filtração à vácuo); 1,0 mL de tampão Britton-Robinson de pH = 11; 0,5 mL de harmane $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração final de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); 0,5 mL de harmine $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração final de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), 1,5 mL de metanol e 2,5 mL de água ultrapurificada. Outra solução como esta foi preparada, porém com a mistura harmane:harmine em concentrações finais de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Para a construção da Curvas analíticas, seis soluções com diferentes concentrações de harmane foram preparadas em tampão Britton-Robinson de pH 11. Foram feitas varreduras sincronizadas de fosforescência das soluções acima com $\Delta\lambda = 109 \text{ nm}$ e $\lambda = 346 \text{ nm}$ e os sinais obtidos foram então derivados (2ª ordem) e as medições consideradas em 322 nm. A curva analítica da 2ª derivada e os parâmetros de mérito estão na Figura 80 e na Tabela 38, respectivamente.

Nas condições otimizadas para a determinação de harmane na presença de harmine em concentrações até 2 vezes maiores (Tabela 36), verifica-se uma faixa linear ($r^2 = 0,9874$) que se estendeu até a concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A precisão de 9,0 % das medições foi avaliada pela repetitividade, a qual foi estimada pelo desvio padrão de medidas consecutivas do sinal de uma solução padrão de harmane $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A sensibilidade deste método foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção absoluto (LDA) e dos limites de quantificação absoluto (LQA). Esses parâmetros (dados pelas Equações 19 e 20) permitem avaliar a sensibilidade em termos de massa de analito depositadas no substrato.

$$\text{LDA} = (3 S_b / m) \cdot V \cdot \text{MM} \quad (19)$$

$$\text{LQA} = (10 S_b / m) \cdot V \cdot \text{MM} \quad (20)$$

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

Conforme mostra a Tabela 38, os limites de detecção e quantificação absolutos encontrados para o harmame foram de 3,1 e 10,3 ng, respectivamente.

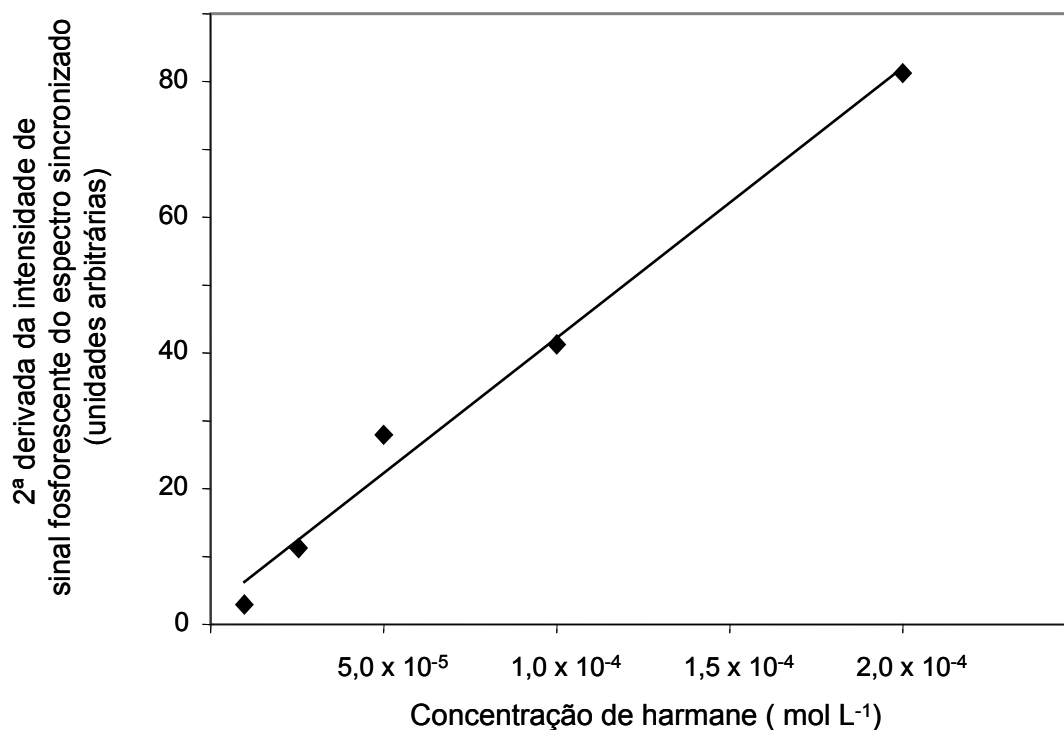


Figura 80: Curva analítica da 2ª derivada da varredura sincronizada

Tabela 38: Parâmetros analíticos de mérito encontrados para o harmame nas condições estabelecidas (Tabela 35) para a sua determinação na presença de harmine (interferente) em concentrações até duas vezes maiores

Parâmetros de Mérito	
Equação da curva analítica	$y = 3,98 \times 10^5 X + 2,2237$
r^2	0,9874
Precisão (%)	9,0
LDA (ng)	3,1
LQA (ng)	10,3

5.1.2.2.4 Testes de recuperação em chás

A forma escolhida para avaliar a exatidão do método fosforimétrico (SSRTP) foi através de testes de recuperação em amostras de chá contendo harmane e harmine (contaminante).

Amostras de chá de camomila, erva-doce e capim cidreira foram enriquecidas com uma quantidade conhecida dos analitos de interesse (harmane $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e harmine $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) segundo o procedimento estabelecido no item 5.1.2.2.2.2.

Utilizando o método proposto para as determinações de harmane na presença de harmine (Tabela 35), a média de recuperação do harmane em amostras de chá contendo $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do harmane e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do harmine, foi de $102\% \pm 5\%$ ($n = 3$), $92 \pm 4 \%$ ($n = 3$) e $95 \pm 7 \%$ ($n = 3$) para os chás de camomila, erva-doce e capim cidreira, respectivamente. Um resumo destes resultados encontra-se na Tabela 39.

Tabela 39: Percentuais de recuperação de harmane em amostras de chá contendo harmane ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e harmine ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

Chá	% Recuperação ($n = 3$)
Camomila	$102 \pm 5 \%$
Erva doce	$92 \pm 4 \%$
Capim cidreira	$95 \pm 7 \%$