2
Instrumentação, materiais e métodos

2.1.Instrumentação

2.1.1. Sistema de lavagem e secagem dos substratos

Com a finalidade de reduzir o sinal de fundo dos papéis utilizados como substrato sólido, estes foram lavados com água quente em refluxo em extratores Soxhlet por duas horas como ilustrado na Figura 6.

Figura 5: Sistema usado para lavagem dos papéis.

Posteriormente, o papel foi colocado para secagem com uma lâmpada de luz infra-vermelha de 150 W (Phillips, Brasil) como mostrado na Figura 7.

Figura 6: Secagem do substrato de papel.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

O substrato de nylon não necessitou de tratamento prévio para a redução do sinal de fundo, sendo diretamente cortados em círculos de 18 mm de diâmetros para posterior utilização na técnica SSRTP.

2.1.2. Reator fotoquímico

Um reator foi montado no laboratório utilizando a carcaça de uma estufa[56]. Na parte interna superior dessa carcaça, instalou-se um conjunto de seis lâmpadas de vapor de mercúrio de 6W cada. Esse reator é utilizado no tratamento de substrato de celulose (2 h) e irradiação de amostras, como mostrado na Figura 8. A emissão máxima das lâmpadas é em torno de 254 e 300 nm.

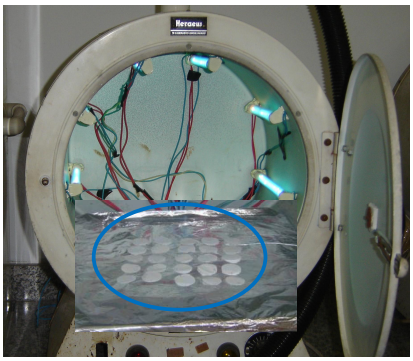

Figura 7: Reator fotoquímico com seis lâmpadas de mercúrio.

2.1.3. Espectrofotômetro de luminescência

As medições de fosforescência foram realizadas em um espectrofotômetro de luminescência comercial da Perkin Elmer modelo LS 55, EUA. O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com 8μs de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5, sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm. O sistema de detecção possibilita o ajuste do tempo de retardo de abertura de detecção. Monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão. Um esquema simplificado do sistema óptico do equipamento é mostrado na Figura 9.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

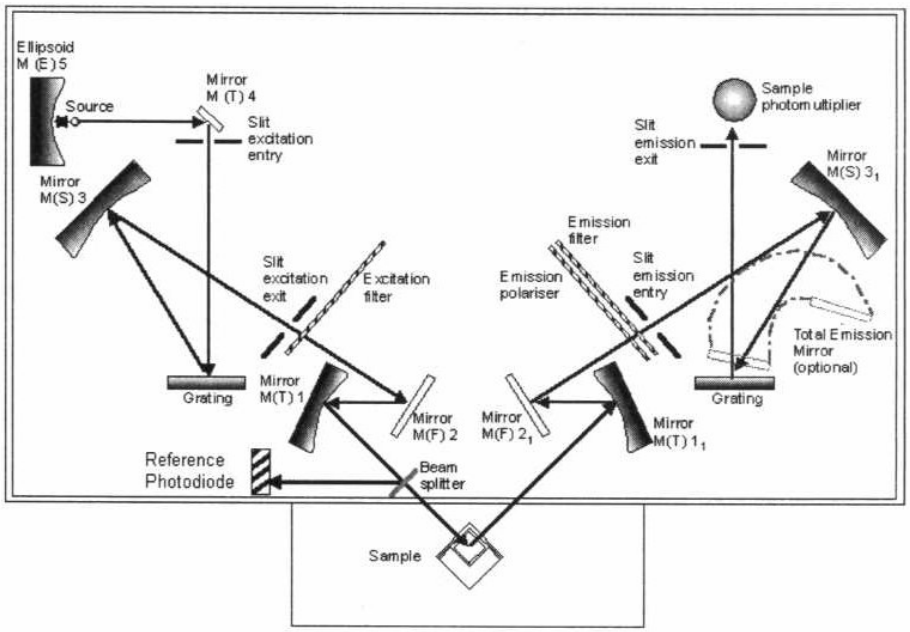

Figura 8: Esquema óptico do espectrofotômetro de luminescência LS 55 – Perkin Elmer.

O aparato de medição em superfície sólida foi utilizado para medição de fosforescência em substrato sólido. Este é acoplado no compartimento de amostra do espectrofotômetro de luminescência LS55 (Figura 10).

Figura 9: Aparato de medição em superfície sólida.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

2.1.4.Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência

Nos testes de comparação foi utilizado um cromatógrafo em fase líquida operando em regime de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência (Waters, EUA). O método empregado foi proposto por Guo et al[26], no qual a fase móvel tinha dois componentes: acetonitrila e acetato de amônio 1 x 10^{-2} mol L^{-1} (pH 3,5). O tampão de acetato (1 x 10^{-2} 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, usando acetonitrila/tampão acetato (pH 3,5) 30/70% v/v. Os tempos de retenção da camptotecina e da irinotecana foram de 7,8 min e 4,0 min, respectivamente.

O detector de fluorescência foi ajustado para medições nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 355/515 nm para a camptotecina e a irinotecana.

A injeção de amostra foi feita manualmente por meio de um sistema de injeção (Reodyne) e alça de amostragem. O tratamento dos dados, integração dos picos e resultado final foi processado pelo software Breeze do próprio equipamento (Waters, EUA).

2.1.5. Outros equipamentos auxiliares

Para a secagem dos substratos sólidos após deposição de amostras ou ensaios em branco, um dessecador a vácuo de polietileno foi utilizado. O dessecador foi coberto com papel de alumínio a fim de impedir a exposição dos substratos sólidos à luz. Esse dessecador foi acoplado a uma bomba de vácuo modelo 820 de 300 W da Fisatom (Brasil) para total retirada do ar.

Todas as massas necessárias para o preparo das soluções foram pesadas em uma balança analítica de marca Shimadzu modelo AUW220D calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro, Brasil), com a resolução de 1 mg.

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).

Para as medições de pH das soluções e para o preparo dos tampões Britton-Robinson, foi utilizado um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3 fornecido pela Tecnopon (São Paulo, Brasil).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

No processo de separação de proteínas da matriz de urina, foi utilizada uma centrífuga modelo BE 4000 Brushless (Bio-Eng, Rio de Janeiro) por aproximadamente 20 min com rotação de 3600 rpm.

A degaseificação de solventes para o HPLC foi realizada em um banho ultra-sônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil).

2.2.Reagentes, soluções e materiais

Os padrões da camptotecina e da irinotecana foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). Camptosar (solução injetável contendo 20 mg mL^{-1} de cloridrato de irinotecana da Pfizer) foi a formulação farmacêutica escolhida para a CPT-11. A topotecana (TPT) foi obtida do medicamento injetável Hyncantim (pó estéril liofilizado contendo cloridrato de topotecana equivante a 4 mg da topotecana livre, da Glaxo SmithKline).

Os sais inorgânicos utilizados no preparo das soluções de átomos pesados foram: nitrato de tálio (I) e cloreto de cádmio da Acros Organics (EUA); nitrato de prata, nitrato de chumbo (II) e cloreto de mercúrio (II) da Vetec (Brasil) e iodeto de potássio da Merck (Brasil). O surfactante utilizado como modificador de superfície foi o dodecil sulfato de sódio (SDS) 99% proveniente da Merck (Brasil).

No preparo das soluções foi utilizado metanol P.A. da Merck (Brasil) e água ultra purificada obtida do Ultra Purificador de água Millipore.

Para ajuste de pH das soluções utilizou-se o tampão Britton-Robinson 0,04 mol L^{-1}, cujo preparo foi realizado com a mistura do ácido orto-fosfórico, ácido acético glacial ambos da Merck (Brasil) e o ácido bórico da Reagen Quimibrás (Brasil). A adição posterior de hidróxido de sódio (Merck) possibilitou a obtenção de soluções-tampões de pH compreendidos na faixa de 2 a 12.

Os substratos sólidos utilizados para a imobilização do luminóforo foram a celulose e o nylon 66. A celulose (papel de filtro Whatman 42) e o nylon 66 com o poro de 0.2 µm utilizados foram da Whatman Ltda (Inglaterra).

O nitrogênio comercial (99,96%) utilizado para purgar o interior do espectrofotômetro de luminescência foi adquirido na AGA (Brasil). Para eliminar resíduos de oxigênio presentes no gás nitrogênio de procedência comercial, foi utilizado o sistema de desoxigenação. Esse sistema consistiu em duas soluções em linha, cuja composição era metavanadato de amônio (Química Moura, Brasil), ácido clorídrico P.A. (Merck, Brasil), zinco em pó (Vetec, Brasil) e mercúrio metálico (F. Maia, Brasil). A eliminação do oxigênio (Figura 11), desse

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

modo, ocorreu pela oxidação do íon metavanadato. Após a passagem do gás nitrogênio nestas duas soluções, o fluxo foi direcionado para duas colunas de sílica (Vetec) de modo que o gás passasse em direção vertical e contra a força da gravidade. Esse procedimento serviu para a remoção da umidade residual.

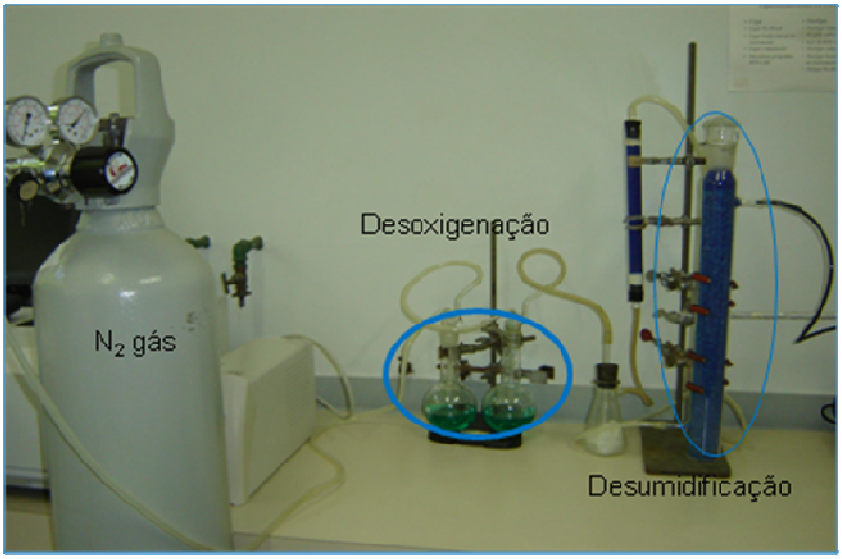

Figura 10: Sistema de purga com nitrogênio, composta por unidade de desoxigenação e de desumidificação do gás.

Uma micropipeta regulável de 1 a 10 µL de fabricação da Brand (Alemanha) foi utilizada para a aplicação das soluções de surfactantes, de sais de átomos pesados e soluções do padrão, branco ou analito no substrato sólido. Para o preparo de soluções foi utilizada uma micropipeta regulável de 100 a 1000 µL da Brand (Alemanha).

2.3.Procedimento geral

As vidrarias utilizadas foram cuidadosamente lavadas em solução de ácido nítrico 10%, v/v. Após ficar imersa na solução de ácido nítrico por um período mínimo de 24 h, a vidraria foi enxaguada com água destilada e posteriormente com água ultrapurificada.

A solução estoque de CPT (4×10^{-4} mol L^{-1}) foi preparada em metanol. O cloridrato de irinotecana (4×10^{-4} mol L^{-1}) e o cloridrato de topotecana (4×10^{-4} mol L^{-1}) foram preparados em água ultra purificada. Soluções com

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

concentrações menores de CPT foram preparadas por meio de diluição da solução estoque com água/tampão Britton-Robinson (pH 10,5).

Soluções estoque de sais inorgânicos de $TlNO_3$ (0,25 mol L^{-1}), $Pb(NO_3)_2$ (0,25 mol L^{-1}), $AgNO_3$ (0,01mol L^{-1}), $CdCl_2$ (0,50 mol L^{-1}), $HgCl_2$ (0,25 mol L^{-1}), KI (0,20 mol L^{-1}) e de surfactante dodecil sulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 0,4 mol L^{-1} foram preparadas em balões volumétricos utilizando água ultra purificada como solvente. Quando necessário, soluções de diferentes concentrações foram preparadas a partir destas.

2.3.1.Procedimento geral para medição da fosforescência

Para a medição da fosforescência foram depositados na superfície do substrato sólido (papel ou nylon) volumes de 5 µL das seguintes soluções, na seguinte ordem: solução de surfactante (quando necessário), 5 µL da solução de sal de átomo pesado e 5 µL da solução padrão, branco ou analito. A aplicação dessas soluções no substrato sólido foi feita com o auxílio de uma micropipeta em uma planilha demarcada (Figura 12) para auxiliar na aplicação da amostra no centro do substrato sólido a fim de minimizar a dispersão dos resultados.

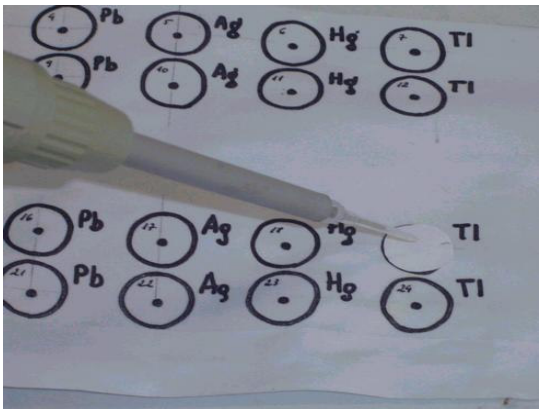

Figura 11: Planilha para auxiliar na aplicação da amostra.

Os substratos sólidos foram secos sob vácuo em um dessecador protegido da luz por aproximadamente duas horas no caso dos substratos de celulose ou por 40 min no caso dos substratos de nylon (Figura 13).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA

Figura 12: Dessecador sob efeito do vácuo e protegido da luz.

No momento das medições cada substrato foi colocado em um suporte e acoplado ao aparato de medição de superfície sólida. Antes da medição o compartimento de amostra do equipamento foi purgado com nitrogênio seco e desoxigenado por um período de aproximadamente 2 min. Em seguida, foram realizadas as medições fosforescentes.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0812597/CA