

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Conforme já foi explicado no início do ponto 3 existe, sempre que possível, um paralelismo perfeito, e propositado, entre os sub-pontos (e seus títulos) dos pontos 3 (Objectivos Específicos e Metodologia), 4 (Material e Métodos) e 5 (Resultados e Discussão). Uma tal estratégia organizativa facilita a consulta, e futura utilização, por leitores eventualmente interessados no seu conteúdo. Assim, por exemplo, os objectivos específicos definidos em 3.1, são concretizados utilizando o Material e Métodos referido em 4.1, e são apresentados os Resultados e sua Discussão no ponto 5.1.

Posta esta explicação prévia, redundante mas necessária, comecemos a descrever o Material e Métodos utilizados.

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS *N*-BENZIL DE ÁCIDOS BILIARES LIVRES

Os cinco ácidos biliares livres (ABL, não conjugados com aminoácidos) utilizados nas sínteses, que são em seguida descritas, foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St.Louis, Missouri, USA) com grau de pureza de 98 % ou superior. Por serem os mais frequentemente encontrados em amostras humanas, nomeadamente de fezes, foram utilizados os seguintes ácidos biliares: ursodesoxicólico; cólico; quenodesoxicólico; desoxicólico; e litocólico.

O complexo de Kovacs (KC, massa molecular 1005,35) foi preparado usando pentaclorofenol (PCP) (Dow Chemical, Midland, MI, USA, 99 % de pureza, obtido de Fluka, Buchs, Switzerland, massa molecular 266,34) e *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (99 % pureza, Janssen Chimica, Beerse, Belgium, massa molecular 206,33), na proporção de 3:1, de acordo com o protocolo proposto por Kovacs [29]. Devido à sua toxicidade o PCP usado neste trabalho foi cuidadosamente reciclado para utilização posterior e manipulado com a máxima segurança possível para evitar contaminações de bancadas (cobertura descartável), da pele (luvas) e das vias respiratórias (máscara).

Todos os produtos cristalinos foram secos sob pressão reduzida, durante pelo menos 12 horas, a 25 °C. Os pontos de fusão foram determinados em duplicado com um aparelho de Fisher-Johns [30] e reportados sem qualquer correcção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ácidos inorgânicos e as bases utilizadas foram obtidos de vários fornecedores, mas eram todos de grau analítico. Os solventes usados eram referidos como próprios para HPLC (HPLC grade).

A piridina foi usada após destilação recente e passagem através de colunas preparativas de sílica, até se verificar estar isenta de aminas primárias resultantes da sua degradação. Essa verificação foi feita por aplicação da piridina obtida em placas de sílica para TLC, que foram depois sujeitas a uma nebulização de ninidrina (Sigma-Aldrich Chemical Co.) a 0,1 % em acetona seguida de aquecimento lento a 65 °C, para detectar a presença de aminas primárias (manchas púrpura em fundo rosa). A piridina, dada a sua toxicidade e cheiro proeminente, foi manipulada em hotes de extracção elevada, com luvas de látex e sempre com utilização de máscara, com filtro de absorção de gases.

4.1.1. SÍNTESE

4.1.1.1 Síntese dos ésteres de pentaclorofenol (PCP) dos cinco ácidos biliares livres

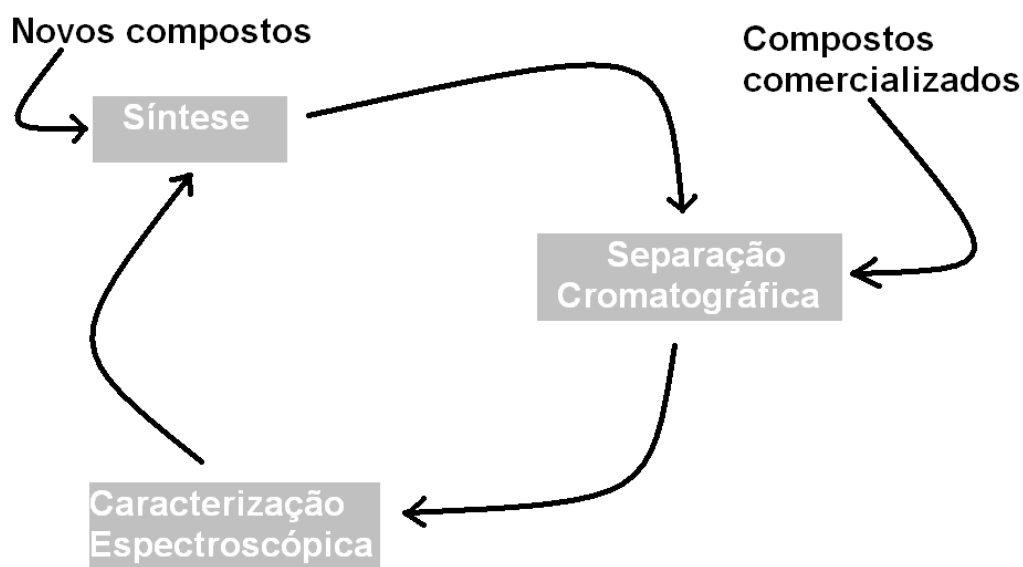
As primeiras sínteses foram realizadas a partir de 100 mg de ácido biliar livre (ABL) com o fito de obter os ésteres activados de PCP (e posteriormente as suas amidas secundárias) com elevado grau de pureza, nesta fase sem grandes preocupações de obter altos rendimentos de reacção. Como estes compostos foram sintetizados por nós pela primeira vez e não dispúnhamos do luxo de poder adquirir um padrão comercial de pureza elevada, decidimos obter um primeiro lote de produto isento de impurezas que facilitasse o desenvolvimento de novos métodos de separação cromatográfica e permitisse a sua primeira caracterização espectroscópica. Com os conhecimentos obtidos nestas duas vertentes, foi depois possível estudar as condições reaccionais que permitem a maximização dos rendimentos de produção destes compostos. A Figura 4. 1 mostra a nossa visão inicial do ciclo de produção e estudo de compostos novos ou mal estudados.

O ABL e o complexo de Kovacs (KC), numa razão molar de 1:8, foram dissolvidos em 50 mL de acetona e levados a refluxo, em balão apropriado, durante 30 minutos.

Quando o ABL já não era detectável por TLC (clorofórmio:metanol:HCl concentrado, 65:35:0,5 v/v), a reacção foi interrompida com a adição de 1 mL de

4. MATERIAL E MÉTODOS

ácido clorídrico concentrado. Numa fase posterior, verificou-se que os rendimentos subiam sempre que a reacção era parada com a adição de etanol (em vez do HCl) e sujeita a refluxo a 65 °C por 15 minutos, antes da evaporação dos solventes.



HF 2009

Figura 4. 1 – Ciclo de produção e estudo de novos compostos, com indicação do ponto de entrada mais habitual para os casos de compostos já disponíveis comercialmente e para o caso de novas sínteses.

Os solventes foram removidos sob pressão reduzida (trompa de água, Venturi) em rotavapor (Buchi) a 65 °C. O resíduo foi retomado em clorofórmio (100 mL) e a solução resultante foi lavada, à temperatura ambiente, em ampola de decantação, por três vezes com 100 mL de HCl 0,1N e também por três vezes com 100 mL de NaOH 0,1N.

As fases contendo NaOH foram acidificadas com HCl concentrado, provocando imediata precipitação. Os microcristais brancos obtidos (PCP) foram depois filtrados e secos. Uma vez redissolvidos em clorofórmio foram aplicados em TLC, em comparação com um padrão de PCP e cromatografados na mistura de solventes usada para os ésteres de PCP dos ABL.

A fase de clorofórmio foi depois seca, cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com várias misturas de clorofórmio-acetona (Tabela 5. 4, Resultados e Discussão) conforme o éster que estava a ser preparado. Foram usadas percentagens maiores de acetona para os compostos mais polares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As fracções recolhidas que continham os ésteres de PCP dos ABL (verificado por TLC) foram evaporadas e sujeitas a recristalização em misturas benzeno-hexano. Para tanto o extracto foi redissolvido, a quente, na mínima quantidade de benzeno possível (menos de 1 mL) e adicionado de n-hexano frio para iniciar a formação imediata de cristais brancos amorfos.

As fracções contendo pequenas quantidades de contaminantes foram ainda sujeitas a uma prévia purificação por HPLC semi-preparativa (Tabela 5.2, Resultados e Discussão), seguida de recristalização para tentar recuperar alguma quantidade adicional de éster.

Foram determinados os pontos de fusão dos 5 ésteres de PCP dos ABL preparados, utilizando um aparelho Fisher-Jones. Os resultados são reportados na forma não corrigida.

4.1.1.2. Estudo dos rendimentos de formação do éster de pentaclorofenol do ácido cólico (CPCP)

As experiências para estabelecer as condições óptimas de reacção para a obtenção de rendimentos máximos do éster de PCP do ácido cólico (CPCP) foram realizadas com 1 mg de ácido cólico e KC num excesso molar de 1:8, num micro-reactor de vidro (5 mL) com válvula Mininert utilizando as seguintes condições de reacção: metanol-clorofórmio (1:1, v/v) à temperatura ambiente (RT), acetona a RT, acetona a 40 °C e a 65 °C e acetonitrilo a 65 °C.

A análise por HPLC dos ésteres de PCP foi realizada numa coluna Nova Pak C18 de 150 mm x 4,6 mm (diâmetro interno), contendo enchimento de granulometria 4 mm, com uma fase móvel de 2-propanol/acetonitrilo/água (65:10:25, v/v/v) a um fluxo de 1 mL/min. A detecção por UV foi feita a 230 nm (0,050 AUFS).

As alturas de pico, obtidas em equipamento HPLC e registadas pelo processador de dados (Waters M730 Data Module) ao longo do tempo, foram medidas para cada uma das quatro condições experimentais, com recurso a uma curva de calibração contendo CPCP em quantidades correspondentes a rendimentos de 133, 100, 66 e 33 %. O ponto correspondente a rendimento de 133 % foi utilizado para permitir, posteriormente, detectar erros devidos a evaporação de solvente volátil a temperaturas acima da ambiente, o que pode ocorrer em situações de falência dos vedantes da válvula Mininert. Foi usado como padrão interno o éster do ácido ursodesoxicólico (UDCPCP) anteriormente

4. MATERIAL E MÉTODOS

obtido em elevado estado de pureza. As razões de alturas analito/padrão interno *versus* rendimento foram incluídas num gráfico de calibração de rendimentos.

As reacções realizadas nas várias condições, referidas acima, foram seguidas por remoção de alíquotas de 5 µL aos 5 minutos e, depois disso, a cada 15 minutos, até um total de 155 minutos. Quando os dados obtidos foram incluídos num gráfico (% de rendimento de formação *versus* tempo) foi possível estimar as condições óptimas de reacção. O ajuste de curvas foi feito pelo método do duplo recíproco de Lineweaver e Burk [1] num programa informático de folhas de cálculo (Quattro, Borland). Após os 155 minutos de tempo de reacção, uma análise TLC das misturas reaccionais permitiu observar os produtos da reacção e a presença de possíveis contaminantes.

4.1.1.3. Formação dos éteres trimetilsilil (TMS) dos ésteres de pentaclorofenol (PCP) dos ácidos biliares livres (ABL)

Para realização de análise por GC e GC-MS foram derivadas, sob a forma de trimetilsilil éteres, amostras de 100 microgramas de cada um dos cinco ésteres de PCP dos ABL, por adição de 100 µL de uma solução recém preparada contendo hexametildisilazano, piridina recém-destilada isenta de amins primárias e trimetilclorosilano (42:32:26,v/v/v). O padrão interno foi o ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colânico (Calbiochem, San Diego, CA, USA), que foi usado na determinação de tempos de retenção relativos (RRT). O éster de PCP de um ABL, o padrão interno e o reagente de derivação, foram aquecidos em conjunto a 65 °C durante 60 minutos, antes de se efectuar a sua injeção para análise em GC.

4.1.1.4. Síntese de *N*-benzilamidas dos cinco ácidos biliares livres (ABL) estudados

As *N*-benzilamidas dos cinco ABL foram inicialmente obtidas por adição ao ABL (100 mg) dissolvido em 50 mL de metanol, de KC e benzilamina, em razões molares de 1:10:90 e manutenção a 65 °C (bloco metálico de aquecimento em banho seco termostatado) durante 15 minutos.

A reacção foi interrompida (adição de 1 mL de ácido clorídrico concentrado) e a mistura reaccional foi tratada como descrito acima para os ésteres de PCP dos ABL (ponto 4.1.1.1), para eliminar excesso de PCP e outros resíduos e purificada por TLC preparativa com eluição com clorofórmio-metanol

4. MATERIAL E MÉTODOS

(95:5, v/v). A sílica gel contendo os compostos desejados (visualizada debaixo de luz UV a 366nm) foi raspada da placa e extraída com acetonitrilo a quente. O extracto foi concentrado a 65 °C e deixado cristalizar à temperatura ambiente. Foram obtidos cristais que, após filtração e pesagem, permitiram verificar que o rendimento de síntese foi de cerca de 20 %.

Os pontos de fusão das 5 *N*-benzilamidas dos ABL foram obtidos em duplicado, com um equipamento Fisher-Johns e reportados sem correcção.

4.1.1.5. Estudo dos rendimentos de formação da *N*-benzilamida do ácido cólico a partir do seu éster de pentaclorofenol (CPCP)

A formação da *N*-benzilamida do ácido cólico a partir do éster CPCP foi seguida por HPLC no sentido de se obterem condições optimizadas de reacção.

Foram dissolvidos em metanol quantidades equimolares (0,24 µmoles) de CPCP e da *N*-benzilamida do ácido ursodesoxicólico (UDCNB, usada como padrão interno), adicionados de uma quantidade conhecida de benzilamina e o volume levado a 2 mL num reactor de vidro Mininert de 3 mL (Supelco Inc., USA), que foi mantido a uma temperatura constante e registada para cada ensaio.

Alíquotas de 10 µL foram retiradas do micro-reactor aos 5 minutos e, após isto, a cada 20 minutos passados, até um máximo 65 minutos e injectadas, imediatamente, num sistema HPLC já descrito acima para as *N*-benzilaminas dos ABL.

Foram realizadas duas séries de experiências.

Na primeira série a temperatura foi conservada constante a 65 °C e foram realizadas 4 experiências com razões molares CPCP:benzilamina crescentes (1:19, 1:38, 1:57, 1:76).

Na segunda série a razão molar CPCP:benzilamina foi conservada a 1:76 e a temperatura foi aumentada de ambiente a 100 °C (18 °C ambiente, 50 °C, 65 °, 100 °C).

As alturas de pico de UDCNB e CNB mostraram ser idênticas quando se injectava uma mistura equimolecular dos dois compostos. As razões de altura de pico CNB/UDCNB foram representadas graficamente em função dos rendimentos de CNB. Os dados obtidos foram ajustados pelo método acima descrito para seguir a formação de CPCP [1] (*vide* 4.1.1.2).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.2. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

4.1.2.1. Cromatografias em Coluna e em Camada Fina

A cromatografia preparativa foi realizada numa coluna de vidro (30 cm x 2,5 cm de diâmetro interno) cheia com sílica gel (100-200 mesh) pelo método dito "molhado" com compactação em clorofórmio. O enchimento da coluna foi lavado previamente com o solvente mais polar a utilizar, para evitar interferências de contaminantes eventualmente presentes na sílica e reequilibrada com o solvente inicial.

A cromatografia em camada fina analítica (TLC) foi realizada em placas de alumínio revestidas com sílica gel (espessura de camada 0,25 mm, área de 0,20 x 0,20 m, Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo um contraste fluorescente capaz de emitir luz verde quando exposto a luz UV de comprimento de onda 254 nm. A eluição das placas foi feita em clorofórmio-metanol (97,5:2,5, v/v) para a separação dos ésteres de PCP dos ABL. As correspondentes *N*-benzilaminas dos ABL foram eluídas em clorofórmio-metanol (95:5, v/v).

Ambos os grupos de compostos (ésteres de PCP dos ABL e *N*-benzilaminas dos ABL) foram detectados primeiro sob luz UV (254 nm) e, depois, revelados permanentemente por nebulização com uma solução de ácido fosfomolibdico [15 % (w/v) em etanol a 95 %] e aquecimento, suave e gradual, em estufa, até 70 °C, com aparecimento de manchas azuis em fundo amarelo.

4.1.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Foi realizada HPLC (analítica e semi-preparativa) num sistema Waters Associates (Milford, MA, USA) que incluía uma bomba de modelo 6000A, um injector U6K com um anel de capacidade máxima 2 mL, um detector de UV de comprimento de onda variável modelo M480 e um integrador/registador Data Module M730.

Os 5 ésteres de PCP dos ABL foram purificados por HPLC semi-preparativa usando uma coluna μ Bondapak C18 de aço inox (300 mm x 7,8 mm diâmetro interno) contendo partículas com diâmetro modal de 10 μ m (Waters Assoc.) sujeitas a um fluxo de 2 mL por minuto. A detecção dos compostos saídos da coluna foi feita por um detector UV a 230 nm (2,0 AUFS). Antes da coluna foi instalada uma pré-coluna (2,4 cm x 4 mm diâmetro interno) contendo

4. MATERIAL E MÉTODOS

o mesmo enchimento da coluna principal. A fase móvel foi ajustada para cada um dos compostos de modo a obter-se uma recolha do pico após cerca de 40 minutos de tempo de residência no interior da coluna (Tabela 5. 5).

Os 5 ésteres de PCP foram depois separados em equipamento analítico de HPLC com utilização de uma coluna Nova Pak C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno, partículas 4 μm), com eluição isocrática em 2-propanol:acetonitrilo:água (58,5:9:32,5, v/v/v) a fluxo de 1 mL/min e detecção/quantificação no UV, a 230 nm (0,050 AUFS).

A mistura das 5 *N*-benzilamidas foi separada em equipamento analítico de HPLC com utilização de uma coluna Nova Pak C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno, partículas 4 μm), com eluição isocrática em 2-propanol:acetonitrilo:acetato de sódio aquoso 10mM (33:17:50, v/v/v) a fluxo de 1 mL/min e detecção/quantificação no UV a 215 nm (0,050 AUFS). A retenção de DCNB foi ajustada para 33,70 minutos (*vide* Tabela 5. 6 e Figura 5.6).

4.1.2.3. Cromatografia gasosa (GC)

A análise por GC foi realizada num cromatógrafo gás-líquido (Hewlett-Packard modelo 5890A) equipado com um injector "on-column" e uma coluna capilar DB1 (100 % metilsilicone, 30 m x 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme), ambos fornecidos por J&W Scientific (Folsom, CA, USA), um detector de ionização de chama e um registador HP modelo 3390A. Durante a análise a coluna foi aquecida a um ritmo de 0,7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 250 a 300 $^{\circ}\text{C}$ e o detector foi conservado a 310 $^{\circ}\text{C}$. O gás de arrasto foi o hélio (N5), a uma pressão de 0,35 bares.

O cromatógrafo usado para GC-MS estava também equipado como acima descrito, mas dispunha de um injector "splitless" e uma coluna capilar DB-5 (95 % metilsilano+ 5 % fenilsilano, 30 m x 0,32 mm de diâmetro interno e 0,5 μm de espessura de filme, J&W Scientific) mantida, durante a análise, a 265 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos. Foi usado hélio (N7) de elevada pureza como gás de arrasto, a uma pressão de 0,35 bares.

Os ésteres de PCP dos 5 ABL foram convertidos a PCP-éster-TMS-éteres para análise. Os tempos de retenção relativos foram calculados tomando como referência os tempos do padrão interno (ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colânico) sob a forma de TMS-éster-TMS-éter.

4.1.3. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

4.1.3.1. Espectrometria de Massa Acoplada a Cromatografia Gasosa (GC-MS)

A análise por espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS) em modo positivo de iões, por impacto electrónico (EI) e ionização química (CI, com isobutano) foi realizada num sistema VG Trio-2 que incluía um analisador de massas de quadrupolo, um amplificador de sinal óptico e um computador DEC microPDP 11/73 equipado com um sistema operativo multi-tarefa (RX 11M Plus versão 3.0) e o software necessário para a manipulação de dados espectrais.

As experiências com inserção directa da amostra (sem GC) foram realizadas num equipamento LKB 9000 [31], em EI com modo de iões positivos. Este aparelho tinha a particularidade histórica de ser o primeiro GC-MS vendido no mundo (1960) e tinha sido usado como protótipo no desenvolvimento das técnicas originais de GC-MS no Karolinska Institute, em colaboração com a LKB. Foi adquirido em 1960 pelo Prof. William H. Elliott (St.Louis, Missouri, USA), que para o introduzir nos EUA, solicitou um decreto do Congresso Americano ("Act of Congress") para poder ser isento de imposto de aquisição. Trinta anos mais tarde continuava a ser um excelente equipamento analítico, sobretudo a partir do momento em que, na década de 1970, foi acoplado a uma interface informática de aquisição de dados.

4.1.3.2. Espectrometria de Massa Acoplada a HPLC

As 5 *N*-benzilamidas dos ABL foram caracterizadas por espectrometria de massa acoplada a HPLC (HPLC-MS-*Thermospray*) tanto em modo de iões positivos como em modo de iões negativos. Os resultados experimentais foram obtidos num sistema HPLC da Shimadzu ligado a uma sonda Vestec *Thermospray*-LC-MS [32].

As condições instrumentais utilizadas foram semelhantes às descritas por Setchell and Vestal [33]. Foram utilizadas as seguintes temperaturas na unidade de *thermospray*: na entrada para o nebulizador 124 °C; no vaporizador 230 °C, na fonte 301 °C, na ponta do aquecedor 313 °C; e no vapor 300 °C. O filamento

4. MATERIAL E MÉTODOS

foi mantido ligado, tanto em modo de iões positivos, como em modo de iões negativos.

Os tampões usados na fase móvel em HPLC, são substituídos por um tampão de acetato de amónio a 10mM com pH=7 que, por ser um sal mais volátil, reduz o risco de entupimento do capilar de saída da amostra, na zona de nebulização.

4.1.3.3. Estudo dos Espectros de UV

Os espectros de UV foram obtidos num espectrofotómetro Beckman DU-70 ligado a uma impressora de matriz de pontos Epson FX-80.

As soluções em etanol a 95 % de cada um dos ésteres de PCP dos 5 ABL (1 mg/25 mL) foram colocadas em tinas de faces paralelas, de quartzo, de 0,5 mL de volume interno e 1 cm de percurso óptico e foram registados espectros de UV entre 200 e 340 nm.

4.1.3.4. Estudo dos Espectros de Infra-Vermelhos

Os espectros de infra-vermelhos foram traçados num espectrofotómetro de duplo feixe Perkin-Elmer Modelo 21 com a amostra (1 %, m/m) dispersa homogeneamente em pastilhas de brometo de potássio anidro com 1 mm de espessura. Os varrimentos ocorreram entre 4000 e 600 cm^{-1} .

Os compostos utilizados na obtenção dos espectros apresentavam o maior grau de pureza que foi possível obter.

4.1.3.5. Estudo dos Espectros de ^1H -RMN

Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos utilizando soluções de 2 mg/0,4 mL em metanol- D_4 (Merck) o mais isento de água possível, com adição de tetrametilsilano como referência interna. Os compostos estudados tinham sido purificados por cromatografia em coluna e cristalizados, apresentando intervalos de fusão estreitos e a sua pureza tinha sido confirmada por vários métodos cromatográficos.

Os espectros foram acumulados num espectrómetro CXP-300MHz (Bruker), à temperatura de 233 °K, entre 0 e 12 ppm de desvio químico (δ). Procedeu-se à integração electrónica dos picos principais para permitir o cálculo de algumas razões de áreas importantes.

4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DA FAMÍLIA DOS PIRENOS

4.2.1. SÍNTESE

4.2.1.1. Éster de pentaclorofenol do ácido pirenobutírico (PyPCP)

O clorofórmio utilizado foi previamente redistilado e seco com sulfato de sódio (ou magnésio) anidro, em excesso. Todo o material de vidro foi seco, em estufa, a 140 °C durante uma noite.

Na síntese de PyPCP começa-se por misturar, em balão de 500 mL, o ácido pirenobutírico (PyCOOH, 347 μ moles ou 100 mg, Aldrich Chemical Co.) dissolvido em 100 mL de clorofórmio (para HPLC, redistilado), com o pentaclorofenol (PCP, 8320 μ moles, Dow Chemical Co.) também dissolvido em 100 mL de clorofórmio. A solução resultante foi aquecida até à temperatura de refluxo (61,5 °C) e adicionada lentamente a diciclohexilcarbodiimida (DCCI, 2770 μ moles, Sigma Chemical Co, frasco aberto pela primeira vez) previamente dissolvida em 100 mL de clorofórmio, originando um volume total de 300 mL. O refluxo foi mantido por 30 minutos e o ponto de conclusão da reacção foi detectado por cromatografia em camada fina (TLC, placas sílica gel com aditivo fluorescente [Referência 105554, Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha, TLC Silica gel 60 F254, 25 placas de alumínio 20 x 20 cm] cortadas em tamanho 5 x 10 cm, fase móvel hexano:acetona 80:20). Para destruir o excesso de DCCI presente no final, a mistura reaccional foi adicionada de 20 mL de etanol a 95 % e sujeita a refluxo por mais 15 minutos.

Após arrefecimento, os produtos de decomposição de DCCI foram removidos por lavagem com 3x50 mL de ácido clorídrico 0,1N (p.a.).

O excesso de PCP foi removido por redução do volume de clorofórmio até à secura (rotavapor a <65 °C, sob pressão reduzida), redissolução em 100 mL de clorofórmio e lavagem por três vezes com 100 mL de uma solução 0,1N de hidróxido de sódio. Estas fases aquosas básicas, uma vez separadas da fase orgânica, foram depois reunidas e acidificadas com HCl 0,1N para precipitar o pentaclorofenol sob a forma de um pó amorfo branco. A fase sólida foi depois

4. MATERIAL E MÉTODOS

filtrada e seca a pressão reduzida. O PCP recuperado foi depois reutilizado em novas sínteses. Dada a sua potencial toxicidade não foi nunca descartado.

A fase orgânica clorofórmica foi seca com sulfato de sódio anidro (p.a.) em excesso, filtrada, concentrada até um volume de 3 mL em sistema rotavapor e cromatografada em coluna.

As fracções eluídas da coluna que continham PyPCP (detectado por TLC) foram evaporadas à secura, retomadas em 1 mL de benzeno quente e sujeitas a cristalização por adição de 100 mL de n-hexano frio. A mistura repousou em frigorífico a 4 °C durante a noite e foi filtrada no dia seguinte por um funil de placa porosa pré-tarado. Os cristais foram colocados numa estufa com pressão reduzida à temperatura ambiente, para eliminar o mais possível os solventes utilizados na cristalização. Foi depois pesado o funil e determinado o rendimento global do processo.

O produto cristalizado foi sujeito a verificações de pureza por várias técnicas cromatográficas (TLC, HPLC).

Após confirmação do grau de pureza do produto cristalino, este foi sujeito a análise elementar percentual (carbono, hidrogénio, oxigénio). Foi utilizada uma aparelhagem Perkin-Elmer, modelo 240C (*Elemental Analyser*). O método utilizado baseia-se na combustão total de uma massa conhecida do composto, seguida da análise dos produtos de combustão. A margem de erro para o hidrogénio foi estimada ser inferior a 5 % quando se analisam padrões validados internacionalmente.

4.2.1.2. Amida primária do ácido pirenobutírico (PyCONH₂)

A amida primária (PyCONH₂) do ácido pirenobutírico (PyCOOH) foi preparada por adição lenta, à temperatura ambiente, de 500 µL de solução de hidróxido de amónio relativamente concentrada (NH₄OH, 25 % em água; p.a., Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) ao éster de pentaclorofenol do ácido pirenobutírico (PyPCP 9,3 µmoles) dissolvido em 5 mL de tetrahidrofurano (THF, para HPLC, recém-destilado), contidos em tubo de reacção de 7 mL (Supelco, 27002-U).

O THF utilizado foi sujeito a refluxo com sulfato ferroso (FeSO₄,7 H₂O; de cor verde clara quando em bom estado) por 2 horas, antes de ser destilado, com o objectivo de eliminar todos os possíveis vestígios de peróxidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A reacção de formação da amida primária foi seguida por TLC, usando uma mistura de hexano:acetona (80:20) como eluente, com o objectivo de detectar o ponto de conclusão da reacção.

No final da reacção a fase homogénea água:THF foi evaporada à secura a 65 °C sob corrente de hélio, o extracto obtido foi redissolvido em 5 mL de clorofórmio e lavado três vezes com 3 mL de ácido clorídrico 0,1 N. A fase aquosa foi removida após centrifugação (4500 rpm/5 min) para desfazer emulsões, por aspiração a pressão reduzida através de uma pipeta Pasteur de vidro. A fase orgânica clorofórmica foi então evaporada à secura sob corrente de hélio (N50).

4.2.1.3. Amina primária do ácido pirenobutírico (PyCH₂NH₂)

Esta síntese foi realizada num saco de luvas plástico, descartável, sob uma atmosfera inerte (de hélio, previamente purgada de oxigénio e humidade). Todo o material de vidro, medidor de oxigénio portátil (GC 501, GC Industries Inc., Fremont, CA, USA, capaz de medir de 0,0 a 25,0 %, v/v) calibrado com ar ambiente, pipetas de ponta de vidro (500 µL, SMI Micro, Disposable Glass Micropipets, modelo D, American Hospital Supply Corporation, Miami, FL, USA) e reagentes, são colocados previamente no interior do saco de luvas (modelo X-27-27, Instruments for Researching and Industry, Cheltenham, Pennsylvania, USA). Este é selado do exterior com uma mola plástica de garra larga (do tipo usado para selar pacotes de batatas fritas já abertos e que se deseja voltar a consumir). O saco é depois sujeito a cerca de 10 a 15 ciclos de pressão reduzida/hélio sob controlo de uma válvula manual de vidro (Firestone valve, Aldrich Chemical Co., Z103616-1EA). Durante a fase de aplicação de pressão reduzida, o saco colapsa sobre o seu conteúdo mas sem retirar a totalidade do gás presente, de modo a impedir a reentrada de oxigénio. Depois destes ciclos constata-se que o teor residual de oxigénio é inferior a 0,2 % no interior do saco de luvas. Os frascos são então abertos e os reagentes pipetados com pontas de vidro previamente colocadas dentro do saco de luvas.

A redução da amida primária PyCONH₂ (estimativa de 5,58 µmoles em extracto seco) é realizada por adição, à temperatura de 0 °C (em banho de gelo), de 500 µL (excesso molar de 1:100) de complexo borano-tetrahidrofurano (BH₃/THF, 1 M em THF; Aldrich Chemical Co.). O complexo de borano-THF foi manipulado tendo em atenção as recomendações do seu fabricante [2, 3, 4].

4. MATERIAL E MÉTODOS

Após fecho dos tubos de reacção com tampa roscada vedada com selo interior a teflon (Supelco, 7 mL, 27002-U) e fecho de todos os frascos de reagentes, o saco de luvas foi aberto. Os tubos de reacção foram colocados num bloco metálico de aquecimento a 65 °C, por duas horas.

A quantidade de hidrogénio gerada durante a reacção é mínima (teórico 250 µL, a condições PTN) e permanece sob ligeira pressão no espaço entre a tampa e a superfície da mistura reaccional (volume estimado 2 mL). Em mais de um milhar de reacções efectuadas nunca aconteceu qualquer rebentamento por sobrepressão, uma vez que o hidrogénio não parece formar, com o hélio, misturas explosivas.

Foi sempre tido o cuidado de não tocar com as pontas de vidro da pipeta no gelo em que as amostras estão mergulhadas. Nos poucos casos em que isso aconteceu inicialmente, logo que a pipeta tocou o reagente BH_3/THF verificou-se uma pronta libertação de bolhas de hidrogénio. Sempre que isso aconteceu, o reagente foi descartado na totalidade, por impróprio, sendo o saco de luvas sujeito a novo conjunto de ciclos hélio/pressão reduzida para eliminação do hidrogénio gerado. De qualquer modo e por precaução, todas as fontes de calor e de ignição foram afastadas da hote onde estava em manipulação o saco de luvas e a válvula de Firestone.

Para eliminar o largo excesso de BH_3/THF , a mistura reaccional foi evaporada à secura a 65 °C, sob corrente de hélio e conservada a seco até que seja futuramente utilizada.

Ao fim de duas horas, a mistura reaccional foi estudada por TLC, em eluente hexano:acetona (80:20), revelada com solução de ninidrina (0,5 % em acetona) e aquecida, gradualmente, em estufa a 65 °C. A amina primária apresentava uma mancha de cor característica (púrpura em fundo rosa).

A mesma redução foi também realizada, com técnica semelhante, com hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4 , solução 1 M em tetrahidrofurano, Aldrich Chemical Co.). O excesso residual de hidreto foi destruído, pela redissolução do extracto seco da reacção em acetona não seca, à temperatura ambiente, em hote com grande extracção, para evitar riscos decorrentes da eventual acumulação de hidrogénio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

4.2.2.1. Cromatografias em coluna e em camada fina

A purificação do éster de PyPCP foi executada por cromatografia em coluna (sílica gel 100-200 mesh, Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) preparada pelo método húmido em n-hexano (50 cm de altura, com um diâmetro interno de 2,5 cm). A coluna foi eluída por gravidade (torneira de fundo totalmente aberta, fluxo estimado de 3 mL por minuto) com uma mistura eluente de hexano:clorofórmio (80:20). Foram colhidas fracções numeradas de 1 a 60, com 5 mL cada. O PyPCP puro foi recolhido nas fracções 30-55, conforme verificado por TLC (placas sílica gel com aditivo fluorescente, 10x5 cm, fase móvel hexano:acetona 80:20). A progressão do PyPCP (fluorescência azul) ao longo da coluna foi seguida, em câmara escura, por iluminação da mesma com uma lâmpada de UV a 366 nm.

O ácido pirenobutírico, o seu éster de pentaclorofenol, a sua amida primária e a sua amina primária, foram aplicadas em quantidades próximas dos 20 nmol cada (20 µL de solução 1 µmole/mL), gota a gota, em placas de sílica gel ([Referência 105554 Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha, TLC Silica gel 60 F254, 25 placas de alumínio 20 x 20 cm]).

As placas, de cerca de 10 cm de altura e cerca de 5 cm de largura, foram eluídas em isooctano:acetona (50:50, v/v) com atmosfera saturada, em caixas de vidro estanques. No final foram secas em estufa a 65 °C por alguns segundos e observadas em semi-obscuridade ou em câmara escura, sob luz ultra-violeta de 366 e 254 nm, para marcação a lápis das respectivas manchas fluorescentes. De seguida as placas foram nebulizadas com uma solução de ninidrina a 0,5 % em acetona (p/v) e aquecidas lentamente em placa de aquecimento ajustada para 40 °C, até ao aparecimento da cor característica de identificação das aminas primárias (púrpura em fundo rosa).

4.2.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

O ácido pirenobutírico, o seu éster de pentaclorofenol, a sua amida primária e a sua amina primária (cerca de 40 pmol em 5 µL de tetrahidrofurano cada, por injeção) foram separados em aparelhagem HPLC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A coluna utilizada era de aço inoxidável, com 0,15 m de comprimento e 0,0039 m de diâmetro interno e continha um enchimento Nova PaK C18 produzido em esferas de 4 µm de diâmetro modal (Waters Associates).

A eluição dos compostos foi feita com uma fase móvel contendo 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de uma solução aquosa 0,01 M de ácido fosfórico a pH 2,22 (v/v/v).

A detecção dos compostos cromatografados foi feita à saída da coluna com um detector de fluorescência (Waters Associates, modelo 420-C), que incluía um filtro de excitação calibrado para transmitir um comprimento de onda central de 340 nm e um filtro de emissão capaz de transmitir comprimentos de onda acima de 370 nm.

O registo dos cromatogramas e sua integração, foram feitos num registador/integrador Hewlett-Packard, modelo 3390A.

4.2.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS-*Thermospray*)

Para a análise por HPLC-MS, utilizando a interface *thermospray*, dos compostos de pireno da fileira descrita, foi utilizada uma coluna capilar revestida com um filme de octadecilsilano, com 50 cm de comprimento, através do qual fluía uma fase móvel composta por 46 % de 2-propanol + 14 % de acetonitrilo + 40 % água a 0,1 mL/min.

O espectrómetro de massa acoplada através da interface *thermospray* era um VG-Trio2 operado debaixo do controlo de um computador PDP com sistema operativo UNIX. O instrumento foi calibrado para a gama de razões massa/carga descritas nas figuras e trabalhou em modo positivo de iões.

4.2.3. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

4.2.3.1. Espectrometria de Massa

Os compostos com estrutura contendo um grupo pireno (PyCOOH, PyPCP, PyCONH₂, PyCH₂NH₂) foram redissolvidos em acetonitrilo. Esta solução foi injectada a um fluxo contínuo de 10 µL/min, num espectrómetro de massa (API 3000, Applied Biosystems), com interface *electrospray* e 3 sistemas de quadrupólo para resolução de massas. Os espectros foram obtidos em modo MS simples, com detecção de iões positivos e negativos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Sempre que foi detectado um pico com uma razão m/z atribuível a um *cluster* de moléculas (exemplo, dímeros com ou sem associação ao sódio), foi efectuada uma experiência MS/MS para observar a fragmentação respectiva.

Foram ainda realizadas experiências MS/MS sobre os picos com razão m/z equivalente à massa molar do composto em estudo, com o objectivo de detectar transições de massa que possam vir a ser úteis em futuros ensaios por HPLC-MS/MS.

Em todas as sessões de trabalho foram analisados os espectros dos solventes utilizados, obtidos em cada um dos modos de iões, de modo a excluir a possibilidade de se investigarem razões m/z que sejam atribuíveis ao solvente utilizado. Pelas mesmas razões foram ainda realizados numerosos ensaios a branco.

No caso do PyPCP foi impossível obter bons espectros através da interface electrospray e foi necessário recorrer a métodos mais convencionais de análise por espectrometria de massa. O composto foi depositado no fundo de um tubo de vidro de parede reforçada e o solvente foi totalmente evaporado. O tubo foi ligado a uma interface de admissão directa de sólidos através de uma câmara de pressão reduzida ("vacuum lock"). Sob pressão reduzida, o vidro foi externamente sujeito a temperaturas crescentes, com incrementos constantes no tempo, até que o composto em análise atingiu o seu ponto de sublimação. Uma vez na fase gasosa, o composto entrou numa câmara de fragmentação onde foi bombardeado com um feixe de electrões. Os fragmentos produzidos foram separados pelos sectores electromagnéticos do espectrómetro de massa convencional (LKB 9000), que já foi descrito no ponto 4.1.3.1.

4.2.3.2. Estudo dos espectros de Ultra-violeta

Os compostos estudados (o ácido pirenobutírico, o seu éster de pentaclorofenol, a sua amida primária e a sua amina primária) foram solubilizados na fase móvel de HPLC mais utilizada (45 % 2-propanol + 10 % acetonitrilo + 45 % de água), na concentração de 50 pmol/mL.

Os espectros de UV-Visível foram obtidos num espectrómetro Carey 300 de duplo feixe, nas seguintes condições experimentais: varrimento a 600 nm/min entre os comprimentos de onda de 250 e 600 nm, com mudança de fonte luminosa aos 350 nm, correcção de linha de base, escala de absorvâncias até 2,5, resolução de 1 nm e tina de quartzo com 0,5 cm de passo óptico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.3.3. Estudo dos Espectros de Infra-Vermelho

Os compostos estudados (o ácido pirenobutírico, o seu éster de pentaclorofenol, a sua amida primária e a sua amina primária) foram incorporados em pastilhas de brometo de potássio seco. Cada pastilha continha cerca de 1 mg de um único composto a avaliar por cada 100 mg de brometo de potássio.

Os espectros de infra-vermelhos foram registados num aparelho Perkin-Elmer modelo 21, com varrimento de frequência entre 4000 e 625 cm^{-1} .

4.2.3.4. Estudo dos Espectros de Fluorescência

Os espectros de fluorescência dos compostos em estudo (o ácido pirenobutírico, o seu éster de pentaclorofenol, a sua amida primária e a sua amina primária) foram obtidos por ensaio de soluções que tinham como solvente a fase móvel mais forte usada para a análise de derivados fluorescentes dos ácidos biliares. Esta fase móvel foi otimizada para a seguinte composição: 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água (v/v/v).

Foram realizados espectros com soluções na concentração de 50 pmol/mL de fase móvel.

O espectrofluorímetro, da marca SLM-Aminco (Spectronic Instruments, Rochester, NY, U.S.A.) e o modelo Spectronic 8100, foi utilizado nas seguintes condições experimentais: velocidade de varrimento 10 nm / s, varrimentos de emissão entre 190 e 600 nm, correcção de linha de base, resolução de 1 nm, correcção de intensidade da lâmpada e célula de faces paralelas de quartzo com 0,5 cm de passo óptico.

4.3. DERIVADOS *N*-PIRENIL DE ANÁLOGOS DA CADEIA LATERAL DE ÁCIDOS BILIARES *N*-CONJUGADOS

O âmbito da expressão genérica “análogos da cadeia lateral de ácidos biliares *N*-conjugados” será exaustivamente debatida no capítulo de Resultados e Discussão (ponto 5.3).

Por agora e para uma mais completa clarificação do que a seguir se descreve, indicaremos que se trata dos pares *N*-acetilglicina/2-etilaminoetanol e *N*-etilacetamida/dietilamina, cuja estrutura é análoga à estrutura em torno do carbono 24 dos ácidos biliares *N*-conjugados e dos seus produtos de redução (aminas).

Estes compostos estão disponíveis comercialmente em elevado estado de pureza (> 99 %, Sigma-Aldrich Chemical Co.) e foram usados sem qualquer purificação prévia.

4.3.1. PRIMEIRAS SÍNTESES DE AMIDAS FLUORESCENTES: SEGUIMENTO POR HPLC

A derivação das aminas intermédias [2-etilaminoetanol (2EAE) e dietilamina (DEA)], com um excesso molar do éster (PyPCP) de pentaclorofenol (PCP) do ácido pirenobutírico (PyCOOH), dá lugar à formação de ácido pirenobutírico livre e de uma amida fluorescente. A reacção é conduzida num solvente orgânico miscível com a água, adicionado de uma pequena proporção de hidróxido de sódio 0,109 M (750:50, v/v) e decorre à temperatura ambiente. Nas primeiras sínteses foi utilizado o acetonitrilo (grau de pureza “para HPLC”) como solvente orgânico miscível com a água.

Foram utilizados dois cromatógrafos diferentes para a realização de análises por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC):

1. Cromatógrafo Perkin-Elmer Integral 4000, com: auto-injector robotizado (programado para injectar em triplicado com volume de amostra de 50 µL), bombas com 4 canais de admissão de solvente, capacidade para realização de gradientes de concentração em função do tempo, detector de ultra-violeta com capacidade de

4. MATERIAL E MÉTODOS

executar varrimentos de comprimento de onda em tempo real e registo em papel utilizando impressora de agulhas (nos primeiros ensaios) ou interface de captação de dados para registo em computador. O detector foi usado a 240 nm (no canal A) e a 342 nm (no canal B) para, propositadamente, obter uma dupla integração de sinal. Esta redundância de dados permite aumentar a robustez aos dados registados e, em raros casos, de má integração num dos canais, permite estimar a área de pico a partir da área obtida no outro canal.

2. Cromatógrafo composto pelas seguintes unidades modulares:
 - a. Bomba Perkin-Elmer (modelo 200) com 2 canais de admissão de solvente;
 - b. Válvula de injeção Rheodyne, com anel de medida calibrado para injectar 20 μL de amostra,
 - c. Detector de fluorescência Waters (modelo 420-C) com filtros de excitação calibrados para 340 nm e de emissão acima de 370 nm;
 - d. Registador/integrador Hewlett-Packard Modelo 3390A.

As colunas utilizadas foram de fase inversa, com enchimento de sílica com revestimento alifático em C18, com 3 ou 5 μm de diâmetro de partícula, conforme a resolução desejada na medida de concentrações. As colunas contendo fase estacionária com granulometria de 5 μm foram usadas para análises de misturas de padrões puros e seguimento de sínteses com um só AB ou análogo de AB. As colunas de menos de 5 μm foram usadas quando se analisaram misturas de ácidos biliares, com o intuito de aumentar a resolução e separar isómeros de características cromatográficas muito próximas (em especial os dihidroxilados). Foram usadas colunas de aço inox de 150 mm ou 300 mm de comprimento, sendo na maior parte das vezes colunas de 4,6 mm de diâmetro interno. Em casos pontuais foram utilizadas colunas de 2,1 mm de diâmetro interno, nomeadamente quando se afinavam separações de compostos que seriam depois usadas a baixo caudal (máximo 300 $\mu\text{L}/\text{min}$) em HPLC-MS e HPLC-MS-MS.

Os solventes utilizados foram sempre filtrados através de membranas com diâmetro de poro de 0,45 μm , em aparelho totalmente em vidro, sob

4. MATERIAL E MÉTODOS

aplicação de pressão reduzida. Foram utilizados solventes orgânicos de grau de pureza "para HPLC" e a água utilizada foi sempre obtida por osmose inversa (Millipore MilliQ).

A fase móvel, utilizada para a separação, fluía a 0,3 mL/min e continha 45 % v/v de 2-propanol, 10 % v/v de acetonitrilo e 45 % v/v de água, à qual foram adicionados 1 mL de ácido acético por cada litro.

As soluções a injectar foram transferidas, imediatamente após preparação, para frascos de 2 mL de cor castanha escura, que foram selados com *parafilm* intacto, até ao momento da primeira injeção. As injeções seguintes (2ª e 3ª) foram realizadas com o *parafilm* já perfurado pela agulha do injector automático (1ª injeção), em área muito reduzida. Mesmo com um intervalo de 12 horas entre as 3 injeções, os resultados obtidos apresentaram sempre baixas dispersões em torno da média ($cv < 5\%$). O uso de *parafilm* foi a solução mais expedita e económica, que respeita o modo de funcionamento do auto-injector, sobretudo se comparada com o encapsulamento com borrachas (*suba-seal*) fixadas por revestimentos metálicos, mais apropriadas quando os frascos são usados em modo descartável. Neste caso, os frascos foram reutilizados, após lavagem eficiente na retirada de todos os compostos fluorescentes. O *parafilm*, além de mais barato e eficiente quanto baste na redução de perdas de solvente por evaporação, foi ainda mais cómodo na preparação para a lavagem (não necessita ferramenta de retirada do encapsulamento).

4.3.2. HPLC: CURVAS DE CALIBRAÇÃO (FLUORESCÊNCIA E UV)

4.3.2.1. As soluções de calibração

Foi usado, como calibrante, o ácido pirenobutírico (PyCOOH) (Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA, 97 % pureza) dissolvido em soluções de 2-propanol:água (750:50, v/v). A solução concentrada contendo 40 $\mu\text{moles/mL}$ de PyCOOH foi preparada em balão de 100 mL. As soluções calibrantes injectadas foram preparadas por diluição em balões de 10 mL e apresentavam concentrações de 50 a 5000 pmol por cada 50 μL injectados. Tipicamente foram utilizados nove níveis de concentração: zero, 50, 125, 250, 625, 1250, 2500, 3750, 5000 pmol por 50 μL injectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na ponta final dos nossos estudos foram também usadas soluções, *stock* e calibrantes, preparadas em etanol absoluto. Para tal 2,88 mg (10 μ mol) de PyCOOH foram dissolvidos em 100 mL de etanol para obter a solução *stock*. As soluções calibrantes, acima descritas, foram também realizadas em etanol, por diluição da solução *stock* (5000 pmol/50 μ L).

4.3.2.2. Tratamento estatístico de controlo de qualidade das curvas de calibração

Foi desenvolvido em Microsoft Excel um modelo de tratamento de dados para avaliação estatística dos resultados. Foram estudadas as áreas de pico e os tempos de retenção obtidos em cada injeção em (pelo menos) triplicado, de todas as soluções calibrantes. Foram calculadas médias, desvios padrões amostrais e erros-padrão das áreas e dos tempos de retenção de cada pico. Para cada concentração foram executados testes t-Student, para determinar se as áreas obtidas eram significativamente diferentes das áreas obtidas para a concentração imediatamente inferior e, para o sinal de ruído de fundo, da solução em branco. Foram ainda criados gráficos de dispersão para visualização e interpretação dos resultados (*vide* anexo I, ponto 8.1).

Para comparação de declives de rectas foram executadas análises de variância (ANOVA). Este tipo de análise permite, por exemplo, verificar se o declive de uma recta de calibração é constante quando as mesmas soluções calibrantes são injectadas, repetidamente, ao longo do tempo. Tal permite aferir se as soluções são estáveis ou se a solução se altera ao longo do tempo (por exemplo, por evaporação no tabuleiro do injector automático). Para realizar estas análises foram criados modelos em Microsoft Excel seguindo de muito perto os algoritmos detalhados apresentados por Sokal e Rholf [35, 36] no capítulo 14, BOX 14.4 (página 477) e BOX 14.7 (página 495) do seu livro. De acordo com o algoritmo definido na tabela resumo de metodologia e interpretação que os autores designam por Box 14.4 é feita uma análise estatística detalhada de regressão das áreas de pico. É assim obtido um grande número de estatísticas relativas a cada recta. Estas estatísticas são depois entradas no algoritmo definido na Box 14.7 que compara, por análise de variância (ANOVA), os declives das várias rectas. Os resultados desta análise são finalmente expressos em intervalos de confiança de coeficientes obtidos por 3 métodos (T' , GT2 e Tukey-Kramer) com base em valores registados no livro de tabelas anexo ao volume

4. MATERIAL E MÉTODOS

principal [36]. Se os intervalos de confiança obtidos para as várias curvas não são significativamente diferentes serão sobreponíveis, pelo menos parcialmente, nos gráficos produzidos para sumariar os resultados do tratamento estatístico por ANOVA.

No anexo I (ponto 8.1) apresenta-se um exemplo de uso do modelo de avaliação básico que foi utilizado no dia-a-dia, para um primeiro registo e análise individual das rectas de calibração obtidas, realizado em MS-Excel. A avaliação incide, sobretudo, na dispersão das áreas de pico obtidas para cada ponto e detecção de pontos com comportamento desviante em relação à recta.

No anexo II (ponto 8.2) apresenta-se um exemplo de uso do modelo proposto por Sokal e Rholf ([35], Box 14.4), realizado em MS-Excel, para avaliação estatística, em profundidade, da regressão linear de uma curva de calibração. Salienta-se neste modelo:

- a) a demonstração de que as áreas obtidas para cada ponto não são todas iguais;
- b) a obtenção de um intervalo expectável para as áreas de pico de cada concentração;
- c) a demonstração da significância da linearidade;
- d) a detecção de pontos de comportamento desviante em relação à recta;
- e) a obtenção de um intervalo expectável para a área de pico correspondente à concentração zero, que pode ser comparado com os de outras curvas, para detectar desvios do ruído de fundo;
- f) a obtenção de estatísticas intermédias para utilização na comparação das inclinações das várias rectas, pelo modelo ANOVA.

No anexo III (ponto 8.3) apresenta-se um exemplo de uso do modelo ANOVA proposto por Sokal e Rholf (Box 14.7) para comparação da inclinação de várias curvas de calibração, realizado em MS-Excel.

No anexo IV (ponto 8.4) apresentam-se as tabelas e gráficos utilizados para verificar desvios significativos do ruído de fundo (concentração zero, ordenada na origem) por um método de comparações múltiplas. Este modelo utiliza como ponto de partida os valores já calculados pelo modelo descrito no anexo II [*vide* ponto 8.2 e alínea e) acima].

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.3. SEGUIMENTO DA FORMAÇÃO DE AMIDAS FLUORESCENTES A PARTIR DE AMINAS (2º PASSO DA REACÇÃO GLOBAL)

4.3.3.1. Qualidade da água utilizada

A água utilizada em todos os ensaios é produzida por osmose inversa numa aparelhagem Millipore MilliQ A10 (Millipore Co., MA, USA). Apresenta tipicamente 4 mΩ/cm de resistência e 3-4 ppb de conteúdo total orgânico (TOC). A água utilizada nas experiências abaixo descritas foi sempre produzida no próprio dia.

Nas situações em que pareceu importante validar resultados com amostras de teores muito baixos, foi utilizada Água Bidestilada Estéril (B|Braun Medical, 20 mL, referência 4252B03) normalmente usada para regenerar preparações farmacêuticas injectáveis de uso humano, comercializadas sob a forma liofilizada. Esta água é fabricada sob rigoroso controlo de qualidade e vem selada em ampolas de polietileno de alta densidade, sob atmosfera de azoto. Foi usada em especial em soluções para conjuntos coerentes de experiências e aberta (com quebra da atmosfera inerte) imediatamente antes da realização das análises.

4.3.3.2. Lavagem do material a utilizar

Os balões volumétricos e os micro-reactores utilizados foram lavados, manualmente, com 5 vezes o seu volume de água MilliQ, seguidos de 5 vezes o seu volume em 2-propanol, seguidos de 5 vezes o seu volume em acetonitrilo.

Os frascos de injeção de 2 mL foram lavados em, pelo menos, 3 volumes de água MilliQ, 3 volumes de 2-propanol e 3 volumes de acetonitrilo. A lavagem é feita em grupos de 20 frascos contidos num copo de 50 mL. A este copo é adicionado o solvente até cobrir todos os frascos e o seu interior (sem bolhas de ar). O copo é sujeito a 5 min de banho ultrasónico aquoso na potência máxima disponível. No final é escurrido o solvente remanescente e os frascos são secos, com o bocal invertido, em estufa a 65 °C.

4.3.3.3. Solução de marcador fluorescente

Pesam-se 3 mg do éster de pentaclorofenol do ácido pirenobutírico (PyPCP, massa molecular 536,676) em frasco de vidro castanho-escuro de 7 mL

4. MATERIAL E MÉTODOS

de volume interno (SUPELCO, 27002-U) com rolha plástica com revestimento de contacto com o líquido em teflon. O éster é depois dissolvido em 5 mL de clorofórmio e o frasco prontamente vedado.

Na ponta final dos estudos descritos nesta dissertação, o clorofórmio foi substituído por acetonitrilo e a solução passou a conter 1 mg/5 mL (limite de solubilidade estimado).

4.3.3.4. Preparação dos tubos de reacção

Trezentos microlitros da solução de marcador fluorescente (PyPCP, 3 mg / mL) são depois distribuídos por frascos de vidro castanho-escuro, de 4 mL de volume interno (SUPELCO, 27001-U), com rolha plástica contendo revestimento de contacto com o líquido em teflon. Este volume residual de clorofórmio é depois evaporado à secura em corrente de azoto à temperatura ambiente. Os frascos são finalmente selados com a respectiva rolha.

Na ponta final dos nossos estudos a quantidade de PyPCP colocado em cada frasco de injeção foi cerca de 10 vezes menor e passou a usar-se uma solução em acetonitrilo (1 mg / 5 mL).

4.3.3.5. Preparação da solução ácida de interrupção da reacção

Começa por se preparar uma solução de ácido acético a 13,6 mM em mistura de água e 2-propanol. Para tanto, são colocados cerca de 80 µL de ácido acético (Merck, número de referência 63, pro-análise) em balão de vidro volumétrico de 100 mL, adicionados de 50 mL de água e completado o volume com 2-propanol (para HPLC).

4.3.3.6. Preparação das soluções de hidróxido de sódio

Cerca de 90 mg (uma micropastilha) de hidróxido de sódio (Riedel-deHaen, referência 30620) são pesados com rigor (até à décima de mg) e introduzidos num frasco de vidro castanho-escuro de 4 mL de volume interno (SUPELCO, 27001-U) com rolha plástica contendo revestimento de contacto com o líquido em teflon. A este são adicionados 3000 µL de Água Bidestilada Estéril Braun (B|Braun Medical, 20 mL, referência 4252B03) ou o mesmo volume de água obtida por osmose inversa.

Desta solução concentrada é retirado para um balão volumétrico de vidro de 50 mL um volume (X mL) correspondente a 13,625 mg de hidróxido de sódio. Para o mesmo balão é ainda adicionada água B|Braun (num volume 3125-X mL)

4. MATERIAL E MÉTODOS

até perfazer volume aproximado de 3125 μL (solução 0,109 M de NaOH). A solução é completada até ao volume graduado com acetonitrilo (50:750, v/v). Esta solução foi, de imediato, usada em ensaios em que o solvente de reacção está pré-misturado, tendo sido descartado o remanescente, uma vez que esta solução se altera facilmente, por carbonatação em contacto com o CO_2 atmosférico.

A solução de hidróxido de sódio foi ainda diluída na mesma proporção (50:750, v/v) com outros solventes, que não o acetonitrilo, para estudo comparativo das condições de reacção da formação de amidas.

Se a diluição do parágrafo anterior não for completada com acetonitrilo ou outro solvente orgânico, tem-se já pronta uma solução 0,109 M de hidróxido de sódio. Esta solução foi usada sempre que a adição dos componentes do solvente de reacção não foram pré-misturados.

Para preparar soluções mais e menos concentradas o valor de X mL de *stock* pode ser multiplicado por uma constante. Assim são referidas neste trabalho soluções 0,109 x 2 M (usados 2X mL de stock), 0,109 x 3 M (usados 3X mL de stock) e assim sucessivamente.

Na ponta final dos nossos estudos optou-se por partir de uma solução concentrada comercial (Merck, Titrisol) de NaOH, em vez de se recorrer às micropastilhas.

O título das soluções stock de NaOH foi verificado, regularmente, por titulação com ácido oxálico de acordo com a técnica descrita na Farmacopeia Portuguesa [5].

4.3.3.7. Preparação da solução de aminas

Foram preparadas soluções (concentrada e diluída) de duas aminas comerciais: 2-etilaminoetanol (2EAE, ponto de ebulição 165 $^{\circ}\text{C}$, massa molecular 89,14, 98 %, Fluka, número de catálogo 02980) e dietilamina (DEA, ponto ebulição 55-56 $^{\circ}\text{C}$, massa molecular 73,14, pureza superior a 99,5 %, Fluka, número de catálogo 31730). Estas duas aminas foram conservadas a 4 $^{\circ}\text{C}$, ao abrigo da luz e, sempre que os frascos originais foram abertos, foi feita uma purga com gás inerte (hélio) do volume entre a rolha e a superfície livre do líquido e executada uma selagem com rolha e *parafilm* exterior.

A solução concentrada foi preparada em balão volumétrico de vidro de 10 mL, ao qual foram adicionados 29 μL de 2EAE ou 30 μL de DEA (medidos de

4. MATERIAL E MÉTODOS

modo diferencial com uma seringa de capacidade máxima 50 μL pré-lavada com a amina a medir) e completado o volume até à marca, com acetonitrilo. A massa de amina adicionada ao balão foi cuidadosamente registada.

A solução diluída, de ambas as aminas, foi preparada retirando 30 μL de solução concentrada, para balão volumétrico de vidro de 10 mL e completando, até à marca, com acetonitrilo. Esta solução diluída deve assim conter cerca de 293 μmoles de amina por 10 mL de solução.

Inicialmente, foi também experimentada a possibilidade de utilizar soluções de amina dissolvida em mistura de solução aquosa de NaOH 0,109 M e acetonitrilo (50:750, v/v).

Esta técnica viria a ser abandonada na ponta final dos nossos estudos, em favor da utilização de soluções de amina em acetonitrilo, que apresentam maior estabilidade.

4.3.3.8. O seguimento da reacção por injeção directa em HPLC, com fases móveis não tamponadas

Adicionaram-se 1050 μL de solução diluída de amina em acetonitrilo a um frasco com PyPCP preparado como anteriormente descrito. O frasco é submetido a 1 minuto de agitação em banho ultra-sónico.

A reacção é iniciada com a adição de 150 μL de solução NaOH (às várias concentrações estudadas: 0,109 M e seus múltiplos e submúltiplos de concentração) de modo a perfazer um volume total de 1200 μL .

A partir da mistura reaccional foram injectadas em HPLC 4 alíquotas de 50 μL em cada um dos tempos de reacção (exemplo: 1, 20, 40 e 60 minutos). A fase móvel de HPLC era constituída por 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água não tamponada (v/v/v). Foi utilizada uma coluna Nova PakC18, 150 x 4,6 mm, com 4 μm de granulometria de enchimento.

Em todas as experiências realizadas foi sempre feito um ensaio em branco, adicionando 1050 μL de acetonitrilo (em vez da solução contendo amina) a um frasco contendo PyPCP e com adição de NaOH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.3.9. O seguimento da reacção com interrupção por adição de ácido

Adicionaram-se 1050 μL de solução diluída de amina em acetonitrilo a um frasco com PyPCP preparado como anteriormente descrito. O frasco é submetido a 1 minuto de agitação em banho ultra-sónico.

A reacção é iniciada com a adição de 150 μL de solução NaOH (às várias concentrações estudadas: 0,109 M e seus múltiplos e submúltiplos de concentração) de modo a perfazer um volume total de 1200 μL .

Da mistura reaccional foram retiradas 5 alíquotas de 200 μL em cada um dos tempos de reacção (exemplo: 5, 10, 15, 20 e 30 minutos), que foram adicionadas a 400 μL de solução de interrupção de reacção, já contidos em frascos próprios para um auto-injector. O volume total ficou então em 600 μL por cada frasco de injeção.

A restante mistura reaccional (cerca de 200 μL) foi deixada evaporar à secura à temperatura ambiente em corrente de hélio (menos de 3 minutos). Foi redissolvida em 1200 μL de solução de interrupção de reacção antes de ser submetida a análise por HPLC.

Em todas as experiências realizadas foi sempre feito um ensaio em branco, adicionando 1050 μL de acetonitrilo (em vez da solução contendo amina) a um frasco contendo PyPCP. Após adição de NaOH, foram retiradas alíquotas a intervalos de tempo constantes e com iguais volumes, que foram sujeitas a uma simulação da interrupção de reacção como a que acima se descreve.

Após a interrupção da reacção, 50 μL de cada uma das soluções foram sujeitas a análise por HPLC, utilizando detectores de fluorescência (excitação 340 nm, emissão > 370 nm) e/ou ultra-violeta a dois comprimentos de onda (240 e 342 nm). A fase móvel de HPLC era constituída por 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água não tamponada (v/v/v). Foi utilizada uma coluna Nova PakC18, 150 x 4,6 mm, com 4 μm de granulometria de enchimento.

4.3.3.10. O seguimento da reacção com interrupção por evaporação rápida: escolha do solvente ideal para dissolução das amidas fluorescentes.

Adicionaram-se 7,5 μL de acetonitrilo e 105 μL de solução diluída de amina em acetonitrilo a um frasco de vidro (volume interno 4 mL) com PyPCP

4. MATERIAL E MÉTODOS

preparado como anteriormente descrito, mas com 1/10 da quantidade de PyPCP (30 µL por frasco, em vez de 300). O frasco é submetido a 1 minuto de vibração em banho ultra-sónico.

A reacção é finalmente iniciada com a adição de 7,5 µL de solução NaOH (às várias concentrações estudadas: 0,109 M e seus múltiplos e submúltiplos de concentração) de modo a perfazer um volume total de 120 µL.

Aos vários tempos de reacção (exemplo: 5, 10, 15, 20 e 30 minutos), o frasco é aberto e rapidamente (menos de 2 min) evaporado à secura em corrente de hélio de alto débito. O extracto seco foi redissolvido em 480 µL de vários dissolventes (fase móvel HPLC, álcoois até C3, acetonitrilo e água) e submetido a vários tipos de agitação (manual, banho ultrasónico a vários tempos) para estudo comparativo da solubilidade do produto final da reacção (amidas fluorescentes).

Em todas as experiências realizadas, foi ainda feito um ensaio a branco adicionando 112,5 µL de acetonitrilo (em vez da solução contendo amina) a um frasco contendo PyPCP. Após adição de NaOH a simulação de reacção foi seguida como descrito no parágrafo anterior.

Cinquenta microlitros de cada uma das soluções foram sujeitos a análise por HPLC, utilizando detectores de fluorescência (excitação 340 nm, emissão > 370 nm) e ultra-violeta a dois comprimentos de onda (240 e 342 nm). A fase móvel de HPLC era constituída por 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água não tamponada (v/v/v). Foi utilizada uma coluna Nova PakC18, 150 x 4,6 mm, com 4 µm de granulometria de enchimento.

4.3.3.11. O seguimento da reacção por injeção directa em HPLC, usando fases móveis tamponadas com acetato de amónio.

Adicionaram-se 7,5 µL de acetonitrilo e 105 µL de solução diluída de amina em acetonitrilo, a um frasco de vidro (volume interno 3 mL) contendo PyPCP, preparado como anteriormente descrito, mas com 1/10 da quantidade de PyPCP (30 µL por frasco, em vez de 300). O frasco é submetido a 1 minuto de agitação em banho ultra-sónico.

A reacção é finalmente iniciada com a adição de 7,5 µL de solução NaOH (às várias concentrações estudadas: 0,109 M e seus múltiplos e submúltiplos de concentração) de modo a perfazer um volume total de 120 µL.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Após reacção a vários tempos (1, 2, 3, 4, 5, 10 e 12 min) e, à temperatura ambiente, foram injectados em HPLC 12,5 µL da mistura reactiva, sem qualquer processamento. A fase móvel utilizada em HPLC continha 45 % de 2-propanol + 10 % de acetonitrilo + 45 % de acetato de amónio 10 mM pH 7 e fluía a 0,3 mL/min. A fase móvel de HPLC era constituída por 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água não tamponada (v/v/v). Foi utilizada uma coluna Nova PakC18, 150 x 4,6 mm, com 4 µm de granulometria de enchimento.

4.3.3.12. Importância do acetonitrilo na reacção: escolha de solventes para a reacção de formação da amida fluorescente.

No ponto 4.3.3.10 foi possível determinar que o melhor solvente para o produto final (amida fluorescente) era o etanol. Resolvida esta incógnita é agora possível visitar algumas das questões não resolvidas a jusante, nomeadamente:

1. Qual a concentração mínima de NaOH para produzir a reacção?
2. Será o acetonitrilo o melhor solvente orgânico para a formação de amidas fluorescentes deste tipo?
3. Qual a percentagem de solvente orgânico a utilizar?

Utilizando a técnica descrita em 4.3.3.10 foram estudadas, comparativamente, reacções a várias concentrações de NaOH, expressas em relação à concentração original de 0,109 M. Assim, por exemplo, concentrações denotadas como 2 x 0,109 M, significam o dobro da concentração original, ou seja 0,218 M de NaOH. A relação de volumes NaOH:solvente orgânico foi mantida em 50:750 (v/v). Uma vez determinada a concentração mínima de NaOH capaz de produzir a formação de amidas fluorescentes deste tipo, esta foi fixada.

De seguida, passou a estudar-se comparativamente o efeito dos vários solventes orgânicos, mantendo constante a relação de volumes NaOH:solvente orgânico (50:750) e a concentração de NaOH utilizada. Foram estudados o metanol, o etanol, o 1-propanol, o 2-propanol, o acetonitrilo, o THF e a fase móvel usada em HPLC (45 % 2-propanol: 10 % acetonitrilo: 45 % água). A fase móvel de HPLC era constituída por 45 % de 2-propanol, 10 % de acetonitrilo e 45 % de água não tamponada (v/v/v). Foi utilizada uma coluna Nova PakC18, 150 x 4,6 mm, com 4 µm de granulometria de enchimento. Uma vez

4. MATERIAL E MÉTODOS

determinado qual o melhor solvente para a reacção de formação das amidas fluorescentes, este passou a ser usado em todas as experiências subsequentes.

Por último, fixado a concentração de NaOH e o solvente orgânico utilizado, foram estudados comparativamente várias razões de volumes NaOH:solvente orgânico, em particular as de 25:775, 50:750, 75:725 e 750:50.

4.3.3.13. O cálculo estatístico e a apresentação gráfica

Os cálculos foram feitos em folhas de cálculo Microsoft Excel, utilizando modelos expressamente desenvolvidos para o efeito (como detalhado no anexo 8.5) e foram completados com gráficos apropriados à representação dos resultados de cada experiência (variáveis de caso para caso) e que estão amplamente representados nos Resultados e Discussão (capítulo 5 deste trabalho).

Cada amostra foi injectada em triplicado e a partir das áreas de pico (não corrigidas) calculou-se a média, o desvio padrão amostral, o coeficiente de variação e o erro-padrão do valor médio.

A média foi usada para calcular a quantidade de pireno que atravessou o detector, em pmol. Dividindo esta quantidade pela quantidade máxima de pireno que se esperaria ver passar no detector e multiplicando por 100, temos uma medida percentual de conversão a cada um dos tempos em que a reacção foi parada (por via ácida ou por evaporação rápida, ou ainda por injeccção directa em HPLC).

Foram, ainda, aplicados testes utilizando a distribuição t-Student para a diferença de valores médios, para detectar se o rendimento percentual em cada ponto é diferente do rendimento do ponto seguinte. Tal permitiu detectar, com certo rigor, o momento em que o rendimento atinge o seu ponto máximo e se mantém depois praticamente constante, por ausência de conversão adicional. Nomeadamente, foram realizados gráficos de rendimento aparente percentual *versus* tempo de reacção (com várias linhas de [amina]/[PyPCP]) e *versus* rácio [amina]/[PyPCP] (com várias linhas de tempo).

Através de um balanço mássico foi apurado o rendimento global da reacção. Para tal foram usadas as quantidades de produto (2EAE-NPy e PyCOOH) estimadas (em pmol) em cada alíquota. Foi ainda estimado o consumo total de PyPCP, para garantir que este estaria sempre em situação de excesso relativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.4. SEGUIMENTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA FORMAÇÃO DE AMINAS A PARTIR DE ANÁLOGOS AMIDA DOS ÁCIDOS BILIARES (1º PASSO DA DERIVAÇÃO)

Para se estudar a formação de amins dos análogos da cadeia lateral dos ácidos biliares, por redução com o complexo $\text{BH}_3\text{-THF}$ em THF, foram realizadas vários ensaios com os seguintes tempos de reacção: 10, 20, 40, 80, 120 minutos.

Para estes ensaios foi utilizado o análogo *N*-acetilglicina (Fluka 01180, Aldrich-Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) em escala de 1 μmole /tubo. No interior de um saco de luvas contendo atmosfera inerte, o reagente $\text{BH}_3\text{-THF}$ 1M foi adicionado em largo excesso (250 μmoles em 250 μL de THF anidro), a 0 °C ou à temperatura ambiente, a tubos que continham o análogo em extracto seco. Os tubos foram cuidadosamente rolhados com tampas com revestimento de *teflon* e sujeitos à temperatura de 65 °C em banho de areia, durante os tempos já indicados, com agitação manual a cada 10 minutos. A reacção foi interrompida por evaporação rápida do solvente em corrente de hélio à temperatura ambiente.

O extracto seco foi redissolvido em acetonitrilo ou etanol e sujeito a estudo por espectrometria de massa. Os espectrómetros utilizados são descritos no parágrafo 4.3.5.

4.3.5. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS REAGENTES E PRODUTOS DO 2º PASSO DA REACÇÃO GLOBAL DE SÍNTESE

Os compostos indicados neste título foram sujeitos a análise por espectrometria de massa. Os espectrómetros (Applied BioSystems, modelos API2000 e API3000) utilizados apresentavam interface de inserção/ionização de amostra do tipo *Electrospray* e três quadrupólos como analisadores de massas, sob total controlo informático do software Analyst (versão 4.1.4). Os vários espectros de massa obtidos foram adquiridos em modos positivo e/ou negativo de iões, conforme as características dos vários compostos analisados. Normalmente, ácidos carboxílicos livres são estudados em modo negativo e amins/amidas em modo positivo.

Estes espectrómetros estavam acoplados a equipamentos HPLC (Agilent, Modelo 1100) para separação cromatográfica. Estes eram compostos de injector automático de amostras, forno para colunas e bombas binárias para bombagem de fases móveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As soluções usadas nos vários estudos foram preparadas de modo a que cada composto se apresente numa concentração de 10 ng/mL. Os solventes usados foram o acetonitrilo e o etanol, com ou sem a presença de quantidades estudadas de NaOH.

Foram cuidadosamente estudadas as contribuições dos solventes e dos restantes reagentes presentes aquando da aquisição dos espectros dos vários compostos. Foi confirmado que as concentrações usadas foram suficientemente elevadas para anular qualquer sinal que não fosse o dos compostos em estudo. Para além disso, só foram considerados os picos de maior intensidade dos espectros, com excepção dos espectros MS/MS em que todos os picos presentes são considerados como provenientes da fragmentação do composto de razão m/z seleccionada.

4.3.5.1. Análogos da cadeia lateral dos ácidos biliares *N*-conjugados

Os compostos *N*-acetilglicina (Fluka 01180, Aldrich-Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) e *N*-etilacetamida (Aldrich 147400, Aldrich-Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) foram utilizados para simular o ambiente molecular em torno do carbono 24 dos ácidos biliares *N*-conjugados e, em particular, dos ácidos biliares glicoconjugados. Estes compostos estão comercialmente disponíveis em níveis razoáveis de pureza (> 97 %, Sigma-Aldrich Chemical Co.)

Os espectros de massa foram obtidos com soluções metanólicas dos dois compostos em concentrações de 10 µg / mL.

4.3.5.2. Aminas secundárias resultantes da redução de análogos da cadeia lateral dos ácidos biliares *N*-conjugados (1º passo da reacção global)

Para a preparação de soluções *stock* o 2-etilaminoetanol (2EAE, 26,5 mg ou 297 µmoles) foi dissolvido em 10 mL de acetonitrilo (grau para HPLC). A solução equivalente de dietilamina (DEA, sob a forma de cloreto de dietilaminónio) continha 32,38 mg ou 295 µmoles por cada 10 mL de acetonitrilo.

As correspondentes soluções diluídas incluíam 30 µL da solução *stock* num volume de 10 mL, completado com acetonitrilo.

Foram obtidos por espectrometria de massa (MS1, análise de massas por um único quadrupólo) espectros de iões negativos e positivos. Os picos referentes aos iões de massa molecular foram depois sujeitos a fragmentação

4. MATERIAL E MÉTODOS

para aquisição de um sinal MS/MS que possa ser característico do composto em análise.

4.3.5.3. Amidas fluorescentes (produtos finais) de análogos da cadeia lateral dos ácidos biliares *N*-conjugados (2º passo da reacção global)

As amidas fluorescentes 2EAE-*N*-Py e DEA-*N*-Py foram obtidas por reacção com o éster de pentaclorofenol do ácido pirenobutírico (PyPCP) em mistura solvente contendo acetonitrilo:NaOH aquoso 0,109M (750:50, v/v). Estas duas amidas não existem comercialmente disponíveis pelo que tiveram que ser estudadas a partir das misturas reaccionais em que foram sintetizadas.

As soluções utilizadas para a caracterização por espectrometria de massa destas duas amidas foram preparadas de modo a ajustar uma concentração de analito da ordem de 10 µg/mL, à entrada do espectrómetro de massa.

4.3.5.4. Produtos secundários da reacção global descrita

Os produtos secundários, pentaclorofenol (PCP, grupo abandonante ou rejeitado) e ácido pirenobutírico (PyCOOH), existem comercialmente disponíveis (Sigma-Aldrich Chemical Co) com níveis de pureza superiores a 97 %. É portanto fácil comparar os seus espectros de massa quando puros e em meio básico, com os espectros obtidos por análise das misturas reaccionais.

O éster etílico do PyCOOH foi identificado em várias misturas reaccionais que foram evaporadas rapidamente à secura, à temperatura ambiente em corrente de azoto e redissolvidas em etanol para maximizar a solubilidade da 2EAE-NPy. Infelizmente não está disponível comercialmente, mas a massa molecular observada é compatível com a sua identificação.

As misturas reaccionais e as soluções padrão foram preparadas de modo a ajustar uma concentração de analito da ordem de 10 µg/mL à entrada do espectrómetro de massa.

4.3.6. SEGUIMENTO DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA REACÇÃO GLOBAL POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Sendo as reacções de síntese do 2EAE-NPy habitualmente executadas a uma escala de 120 µL de volume total reaccional e sendo necessário um volume de cerca de 500 µL para encher a tina de quartzo até ao nível mínimo para

4. MATERIAL E MÉTODOS

detecção de fluorescência, foi realizado um aumento de escala da reacção (*“scale-up”*). Este aumento foi realizado por incremento proporcional dos volumes de cada um dos reagentes adicionados, de modo a manter as condições reaccionais previamente optimizadas.

Foi utilizado um espectrofluorímetro de marca SLM-Aminco (Spectronic Instruments, Rochester, NY, U.S.A.), do modelo Spectronic 8100, nas seguintes condições experimentais: configuração L, velocidade de varrimento 10 nm / s, varrimentos de emissão entre 190 e 600 nm, correcção de linha de base, resolução de 1 nm e tina de quartzo com 0,5 cm de passo óptico. A fluorescência emitida foi corrigida para a resposta instrumental das lâmpadas em uso, para se evitar os problemas associados à perda de intensidade ao longo do tempo (envelhecimento da lâmpada).

4.3.7. SEGUIMENTO DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA REACÇÃO GLOBAL POR ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE LUZ (“LIGHT-SCATTERING”)

Para fazer este seguimento a reacção foi realizada à escala de 500 µL por escalamento proporcional, como descrito no número anterior. Todas as misturas reaccionais foram sujeitas a ultra-sons por 1 min antes da adição de NaOH 54,5 mM.

Para explorarmos a possibilidade de utilizar o cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazol (C_{12} MIMCl) como estabilizante das misturas reaccionais contendo as amidas marcadas, executámos uma síntese de 2EAE-NPy nas condições padrão já definidas, mas à escala de 1000 µL de volume total. Ao fim de 15 min à temperatura ambiente, repartimos a mistura reactiva em volumes iguais por vários tubos e evaporámos cada um deles à secura em corrente de azoto, também à temperatura ambiente. Os vários extractos obtidos foram redissolvidos em etanol (valor de referência UV) e em várias concentrações de C_{12} MIMCl dissolvidas em acetonitrilo ou em água. Todas as soluções foram sujeitas a vibração ultra-sónica durante 1 min.

Foram depois ensaiadas, em paralelo, por espectroscopia de dispersão de luz e por espectroscopia de UV (após diluição a 1/10).

Os ensaios de espectroscopia de dispersão de luz (*“light scattering”*) foram realizados num espectrómetro Zetasiser Nano Series ZEN3600 (Malvern, UK) utilizando um laser de 633 nm. A detecção foi feita com recurso a uma

4. MATERIAL E MÉTODOS

técnica, não invasiva, de dispersão de retorno ("back scattering") a um ângulo de 173°. A temperatura da tina no interior da câmara de medição foi mantida a 298,2±0,1 K. Cada medida é uma média de 5 leituras consecutivas realizadas em regime automático. Foi tida em conta a viscosidade do solvente e os parâmetros operacionais (atenuação do sinal, distância focal e número de varrimentos) foram previamente otimizados para se obterem as melhores estatísticas. Os ensaios foram efectuados em células de vidro de faces paralelas e com tampa estanque, de secção 1 cm², submetidas a uma lavagem prévia cuidada, utilizando os solventes filtrados que foram utilizados nos ensaios. A água foi filtrada através de uma seringa de vidro acoplada a um cartucho de filtração Millex FG (PTFE) de 0,2µm (Whatmann, Schleicher & Schuell, referência de catálogo 6786-1302). O acetonitrilo foi filtrado por cartuchos Millex HV (Durapore, PVDF) de 0,45 µm (Referência SLHV033RS, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA).

Os ensaios de espectroscopia de absorção no UV foram realizados num espectrómetro Carey 300 de duplo feixe, nas seguintes condições experimentais: varrimento a 600 nm/min entre os comprimentos de onda de 250 e 600 nm, com mudança de fonte luminosa aos 350 nm, correcção de linha de base, escala de absorvâncias até 2,5, resolução de 1 nm e tina de quartzo com 1 cm de passo óptico. O sinal UV foi registado como a diferença entre a absorvância máxima na região 342-346 nm e a média de absorvâncias dentro da região espectral 380-400 nm onde não se observou qualquer pico. Foi depois convertido em percentagem em relação ao sinal UV do extracto redissolvido em etanol considerado como referência e onde não é suposto ocorrer agregação.

Para a realização da reacção em meio aquoso, tentou dissolver-se o PyPCP em água com ou sem tensoactivo (30mM C12MIMCl). A amina 2EAE foi também dissolvida em água. O hidróxido de sódio a 54,5 mM já estava dissolvido em água. Com todos os reagentes dissolvidos em água, a sua adição foi feita nas proporções volumétricas habituais. A adição do NaOH foi antecedida de 1 min de vibração em banho ultra-sónico.

4.3.8. A ESTRUTURA 3D DOS DÍMEROS DE AMIDA FLUORESCENTE (2EAE-NPY)

Para estudar a estrutura tridimensional da 2EAE-NPy e seus dímeros, foram montados modelos moleculares do tipo "pau-e-bola". Pretendia também

4. MATERIAL E MÉTODOS

estudar-se quais as forças intermoleculares que estabilizariam o dímero, em particular as que resultam da inclusão de um catião sódio nesta estrutura.

Para uma primeira abordagem deste assunto, foi decidido recorrer aos modelos criados em 1973 por M. A. Lowrie, que são comercializados pela firma Cochranes of Oxford Ltd, Oxford, Reino Unido. Em particular utilizou-se o sistema miniaturizado Minit. Neste sistema os diferentes átomos (e suas formas híbridas) são representados por cores bem definidas: branco para o hidrogénio, negro para o carbono, vermelho para o oxigénio e azul para o azoto. As ligações intramoleculares são representadas por tubagens plásticas de cor verde clara e estão representadas à escala com distâncias internucleares calculadas a partir dos raios iónicos ou covalentes, de acordo com a tipologia da ligação.

Para estudar a estrutura do dímero começámos por preparar dois modelos 3D independentes da 2EAE-NPy. Cada um deles foi cravado numa semi-esfera de poliuretano, imediatamente após ter sido orientado espacialmente para a conformação que corresponde à formação do dímero.

Após orientação e cravagem, os modelos foram analisados à procura de possíveis interacções intermoleculares do tipo: pontes de hidrogénio, Van der Waals e ião-dipólo. Uma vez detectadas estas interacções, os modelos foram fotografados à resolução de 1,3 megapixels com a câmara fotográfica de um telefone móvel, tirando partido das excelentes condições do mecanismo conhecido por "macro" (fotografias de alvos a curta distância). Em algumas fotografias de vista-geral dos modelos foi incluído um objecto (exemplo, uma esferográfica) com dimensões familiares à maioria dos leitores, para induzir a noção de escala utilizada.

Sobre as fotografias detalhadas foram introduzidas, electronicamente, setas de várias cores que mostram as várias interacções intermoleculares observadas entre os dois monómeros de 2EAE-NPy.

Finalmente, foi introduzido nas fotografias, por processamento electrónico com o programa MS-Paint, um catião sódio com as dimensões apropriadas. Sobre esta montagem foram salientadas as ligações intermoleculares ião-dipólo que se verificam entre o dímero de 2EAE-NPy e o catião sódio.

4.4. DERIVADOS *N*-PIRENIL DE ÁCIDOS BILIARES *N*-CONJUGADOS

4.4.1. SÍNTESE

4.4.1.1. O primeiro passo da reacção global

As soluções padrão de ácidos biliares foram preparadas em metanol na concentração de 1 μ mole / mL. Os ácidos biliares *N*-conjugados utilizados foram adquiridos à Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA (actual Sigma-Aldrich Chemical Co.) em estados de pureza variando entre 97 e 99 %. Alguns destes compostos apresentavam-se na forma ácida e outros na forma sódica.

Os ácidos biliares da série 5 β conjugados com o aminoácido glicina no carbono 24 foram os seguintes: glicocólico (GCA), glicoursodesoxicólico (GUDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA), glicodesoxicólico (GDCA) e glicoliticólico (GLCA).

Os ácidos biliares da série 5 β conjugados com o aminoácido taurina no carbono 24 foram os seguintes: taurocólico (TCA), tauroursodesoxicólico (TUDCA), tauroquenodesoxicólico (TCDCA), taurodesoxicólico (TDCA) e taurolitocólico (TLCA).

Foi ainda utilizado um ácido biliar duplamente conjugado. O 3-sulfato-glicoliticólico que é conjugado com o aminoácido glicina no carbono 24 e sulfatado no hidroxilo em posição 3 α (GSLCA).

Como padrão interno foi utilizado um ácido biliar da série 5 β que não aparece nas amostras biológicas humanas, sintetizado e comercializado pela Calbiochem (La Jolla, California, USA). Trata-se de um parente próximo do ácido cólico que não apresenta hidroxilo na posição 3 α , sendo todo o resto da molécula exactamente igual. Existe comercializado na forma de ácido biliar livre, ou conjugado com a taurina. É designado por ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colânico.

Os testes iniciais do primeiro passo da reacção global envolveram a transferência de 1 mL da solução de ácido biliar *N*-conjugado, preparada como se indicou acima, para frascos de reacção de volumes internos de 4 mL, de vidro de cor castanha, com tampa com forro interno de teflon (Supelco, 27001-U).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Mais tarde, a reacção foi conduzida em frascos de fundo cónico, do mesmo tipo de material e tampa (referência Supelco 508896).

O ácido biliar em metanol foi evaporado à secura em corrente de hélio (pureza 99.999990 %, N70, desumidificado e desoxigenado) à temperatura ambiente. Foi depois reduzido, em atmosfera inerte, por adição de 250 µL de complexo borano-THF (BH₃-THF, 1 M em tetrahidrofurano) à temperatura de 0 °C (gelo fundente) e subsequente manutenção de uma temperatura de 65 °C durante um tempo variável.

A adição do reagente foi feita, com os frascos e reagente à temperatura de 0 °C, dentro de um saco-de-luvas de plástico, transparente (modelo X-27-27, Instruments for Researching and Industry, Cheltenham, Pennsylvania, USA), ao qual foi retirado o oxigénio por cerca de 20 ciclos consecutivos de pressão reduzida (para retirar oxigénio) e entrada de gás inerte (hélio ou azoto, para diluir o oxigénio restante). Os ciclos são feitos através de uma válvula manual de Firestone (Aldrich Chemical Co., Z103616-1EA) que fornece alternadamente pressão reduzida e gás inerte. O conteúdo em oxigénio no interior do saco foi monitorizado por um detector portátil com sensor electroquímico (GC 501, GC Industries Inc., Fremont, CA, USA, capaz de medir de 0,0 a 25,0 %, v/v, calibrado em cada utilização com ar ambiente para 20,9 %) até que atingisse valores inferiores a 0,1 %. A essa concentração de oxigénio é possível abrir as garrafas de BH₃-THF, sem destruir o reagente por reacção com o resíduo de oxigénio restante. Os valores de % de oxigénio, no final da entrada de gás inerte e após a pressão reduzida, foram registados em cada um dos 20 ciclos, para referência futura e detecção da existência de fugas no plástico do saco-de-luvas.

No final do primeiro passo da reacção global, o reagente BH₃-THF é evaporado à secura em corrente de hélio e à temperatura ambiente. O resíduo, constituído por aminas dos ácidos biliares, pode ser conservado a seco indefinidamente, ou retomado em metanol ou acetonitrilo para realização do segundo passo da reacção global.

4.4.1.2. O segundo passo da reacção global

O segundo passo da reacção global envolve a reacção das aminas de ácido biliar formadas no primeiro passo, com um excesso molar de 1:5 do éster de pentaclorofenol do ácido pirenobutírico (PyPCP) em presença de uma base forte (NaOH).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nos primeiros ensaios as aminas (1 μ mole) foram colocadas num novo frasco e evaporadas à secura. Foram adicionadas de PyPCP dissolvido em acetonitrilo (grau de pureza "para HPLC") e sujeitas a vibração em banho de ultrasons durante 1 minuto, na potência máxima disponível. Quando o PyPCP e as aminas estão redissolvidos no acetonitrilo é adicionada uma solução aquosa de 0,5 x 0,109 M de hidróxido de sódio para início da reacção. O frasco é mantido sem agitação durante 15 min, à temperatura ambiente. As soluções são preparadas de modo a que no final da adição de reagentes a proporção acetonitrilo:água seja de 750:50 (v/v).

Os derivados fluorescentes preparados (amidas) são depois injectados para análise quantitativa por HPLC, após 15 min exactos de reacção.

4.4.2. OPTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO POR HPLC DE 12 ÁCIDOS BILIARES N-CONJUGADOS

Foi utilizado um equipamento Perkin-Elmer modelo 4000, com autoinjector, bombas quaternárias, detector de UV com fotodíodos e aquisição de dados por via informática com o software TurboChrom versão 4 para Windows 95. A este equipamento foi por vezes adicionado um detector de fluorescência com sinal analógico de 1V, interfaciado com o computador via um conversor analógico/digital Perkin-Elmer 900.

Como meio analisador da amostra foi usada uma coluna de aço inox de 15 cm, com diâmetro interno de 4,6 mm, contendo um enchimento NovaPak C18 com partículas de diâmetro 4 μ m.

Os solventes orgânicos usados foram todos de grau para HPLC. Foram usados etanol, acetonitrilo e 2-propanol. A água utilizada foi obtida por desionização em resinas de troca iónica seguida de osmose inversa de água (18 mOhm / cm e 4 ppb de conteúdo orgânico total) em equipamento MillieQ (Millipore Corporation, USA).

Os tampões utilizados foram preparados com ácido acético para cromatografia e acetato de amónio pró-análise. Os valores de pH final foram ajustados com recurso a um potenciómetro com eléctrodo apropriado, calibrado diariamente com soluções de referência de qualidade validada e sujeitas a rastreabilidade.

As fases móveis preparadas foram filtradas por filtros de pelo menos 0,45 μ m de diâmetro de poro e sujeitas a vibração em banho ultrasónico por 15 min à

4. MATERIAL E MÉTODOS

potência máxima disponível. Estas fases móveis foram sempre preparadas em quantidades que são totalmente utilizadas no prazo máximo de 48 h.

As fases móveis assim preparadas fluíram através da coluna e dos restantes componentes do equipamento, à temperatura ambiente, a fluxos de 0,3 mL / min. A este fluxo a pressão de retorno da coluna é de cerca 1100 psi. O método estabelecido incluía uma pressão mínima de 200 psi e uma máxima de 4000 psi.

A detecção dos compostos à saída da coluna foi feita por absorção no UV a 342 nm, ou por fluorescência com excitação a 340 nm e emissão acima de 370 nm.

O sinal adquirido pelo software foi registado em cromatogramas e as áreas dos picos foram obtidas por integração automática (sempre que possível), ou manual (nos casos mais difíceis, por exemplo, proximidade excessiva de dois picos).

4.4.3. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A caracterização destes compostos por espectrometria de massa foi feita inicialmente por Fast Atom Bombardment (FAB, também conhecida por LSIMS ou *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*) em matriz de glicerol e bombardeamento com uma corrente de átomos de xénon acelerados. Foram registados espectros em modo de iões positivos (FAB⁺) e em modo de iões negativos (FAB⁻). O equipamento utilizado era da marca VG e do modelo Trio2, com possibilidades de receber amostras através de uma câmara de pressão reduzida (inserção directa, *vaccum lock*), ou através de uma interface aquecida directamente de um cromatógrafo gás-líquido. O sistema era controlado por computador durante a aquisição de sinal, mas a sintonização (ou *tunning*) era sempre feita manualmente, através de um cinescópio apropriado, com recurso a PFK (perfluoroqueroseno de baixa gama de ebulição, 70-110 °C, Fluka, nº de catálogo 77277).

Para a realização de ensaios, a sonda FAB era carregada, na sua extremidade, com uma gota de glicerol, ao qual eram adicionados até um máximo de 20 µL de amostra (misturas reaccionais e soluções puras dos reagentes). A extremidade da sonda era depois sujeita a pressão reduzida, até equilíbrio com a pressão interna do espectrómetro e bombardeada com um feixe de átomos de xénon acelerados. Os iões que se soltavam da matriz, após o

4. MATERIAL E MÉTODOS

impacto com o xénon, eram sugados para o interior do espectrómetro de massa, onde eram focados e separados em função da sua razão massa/carga (m/z) através de um sector electromagnético. Os iões separados eram detectados num tubo fotomultiplicador e o sinal eléctrico adquirido era enviado ao computador para processamento de espectros.

Foram diariamente realizados ensaios a branco para detecção dos picos que provêm da matriz de glicerol.

4.5. BIBLIOGRAFIA

-
- 1 Lineweaver H, Burk D - The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. **56**, 3: (1934) 658-666.
 - 2 Technical Information Bulletin No. AL-135. Equipment for Handling Air-Sensitive Reagents. Editado por Aldrich Chemical Co. em 1983.
 - 3 Technical Information Bulletin No. AL-195. Instructions For Using The Oxford Sure/Seal Valve-Cap. Editado por Aldrich Chemical Co. em 1988.
 - 4 Technical Information Bulletin No. AL-134. Handling Air-Sensitive Reagents. Editado por Aldrich Chemical Co. em 1983.
 - 5 Farmacopeia Portuguesa IV. 2ª edição, Imprensa Nacional de Lisboa, 1946, páginas 311-312.