

## INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NO SINAL DE FLUORESCÊNCIA DA 7-HIDROXICUMARINA

**Mirian Marcolan (PG)<sup>1\*</sup>, Priscila Afonso Martins (IC)<sup>1</sup>, Clarissa R. G. de Lima (IC)<sup>1</sup>, Maira R. R. Magini (PQ)<sup>1</sup>, Hueder P. M. De Oliveria (PQ)<sup>1</sup>, Lucia Codognoto (PQ)<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12244-000, São José dos Campos – SP, Brasil, \*mirianmarcolan@yahoo.com.br

**Resumo** – A 7-hidroxicumarina é o metabólito ativo da cumarina, que possui propriedades antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória e anticoagulante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do solvente nas propriedades espectroscópicas da 7-hidroxicumarina, visando o desenvolvimento de uma metodologia analítica usando a espectroscopia de fluorescência para a quantificação da 7-hidroxicumarina em fluidos biológicos. A 7-hidroxicumarina apresentou máximos de excitação e emissão em 335 nm e 450 nm, respectivamente. Os resultados indicaram a dependência do sinal espectroscópico da 7-hidroxicumarina com o solvente. A variação do sinal de fluorescência em função da concentração de 7-hidroxicumarina apresentou linearidade ( $r = 0,999$ ) no intervalo concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, com LD de 1,6 µg L<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam a possibilidade para o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de 7-hidroxicumarina em fluidos biológicos, utilizando a espectroscopia de fluorescência, uma vez que a concentração plasmática máxima de 7-hidroxicumarina após alguns minutos é de 6,8 6 µg L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** 7-hidroxicumarina, fluorescência, espectroscopia, medicamentos.

**Área do Conhecimento:** Ciências Exatas e da Terra (Química).

### Introdução

As Cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontrados em fungos e bactérias. A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, como a antimicrobiana, a antiviral, a antiinflamatória, antiespasmódica, a antitumoral e a antioxidante (PEREIRA, et al. 1992).

Atualmente mais de 1300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes, sendo que as propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas da cumarina simples dependem de seus padrões de substituição (RODRIGUES et al. 2005).

A cumarina simples (Figura 1A) apresenta propriedades terapêuticas como anticoagulante onde inibe a ativação de vitamina K, sendo esta cofator nas reações de formação dos fatores de coagulação, tendo em vista que sua deficiência provoca alteração nos processos de coagulação (HOULT et al. 1996). Adicionalmente, apresenta ação bronco-dilatadora e antiinflamatória pela inibição do metabolismo das prostaglandinas e leucotrienos. Atualmente a cumarina tem sido amplamente utilizada em pesquisas para redução de células neoplásicas. Seu bom sinal de

fluorescência permite a esta substância o uso como marcadores de enzimas de DNA e tinturas laser (HOUSTON et al. 2007; GAYATHRBI et al. 2008)

A 7-hidroxicumarina (Figura 1B) é o metabólito plasmático ativo da cumarina. A cumarina é absorvida no organismo e metabolizada em hidroxycumarina, em seu processo de excreção este metabólito liga-se ao ácido glicurônico o qual o deixa mais polar a fim de facilitar a excreção do fármaco do organismo.

A detecção simultânea do metabólito 7-hidroxicumarina na fase I do metabolismo e 7-hidroxicumarina-glucuronídeo tem sido realizada por eletroforese capilar com detecção de UV (DUFFY et al. 1998). Adicionalmente, estudos realizados sobre as propriedades antitumorais e antimetásticas da 7-hidroxicumarina mostram que esta apresenta maior potência inibitória frente a células proliferativas tumorais do que a cumarina simples (ELINOS-BÁEZ et al. 2005).



**Figura 1:** A) Fórmula estrutural da cumarina. B) Fórmula estrutural da 7-hidroxicumarina.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o avaliar a influência do solvente nas propriedades espectroscópicas da 7-hidroxicumarina, visando o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de 7-hidroxicumarina em fluidos biológicos.

## Materiais e métodos

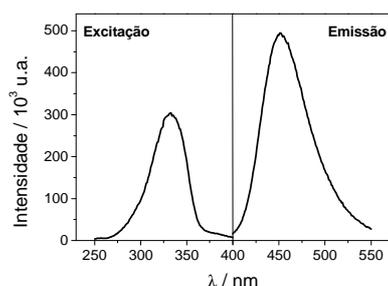
As medidas foram realizadas utilizando espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex fluoromax-2 com varredura de 200 a 800 nm, com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

As soluções de cumarina padrão (Ardich 99%) foram obtidas a partir de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em acetonitrila. Os solventes utilizados para os estudos foram água Milli-Q, etanol, dioxano e acetonitrila.

O efeito da concentração de 7-hidroxicumarina no sinal de fluorescência foi avaliado no intervalo de concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

## Resultados e Discussão

Inicialmente foram obtidos os espectros de excitação e emissão para a 7-hidroxicumarina. Na Figura 2 encontram-se os espectros de fluorescência (excitação e emissão) obtidos para a 7-hidroxicumarina, onde observa-se que os máximos de excitação e emissão são em 335 nm e 450 nm, respectivamente. Desta forma, o valor de 335 nm foi comprimento de onda de excitação utilizado para a obtenção dos espectros de emissão.

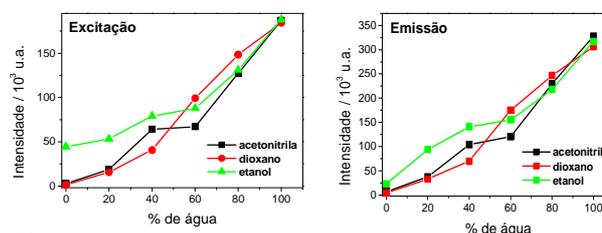


**Figura 2:** Espectro de excitação e emissão para a 7-hidroxicumarina ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em meio aquoso.

O efeito, dos solventes, água, acetonitrila, dioxano e etanol, na intensidade do sinal de fluorescência da 7-hidroxicumarina, foi avaliado buscando as condições onde se obtém melhor sinal analítico.

Os resultados obtidos indicaram que a 7-hidroxicumarina apresenta maior sinal de fluorescência quando água é utilizada como solvente (Figura 3). Esse dado indica que há uma maior interação entre as moléculas de água com a

da 7-hidroxicumarina via processo de solvatação tanto do estado fundamental da mesma quanto do estado excitado.



**Figura 3:** Variação da intensidade do sinal de excitação e emissão ( $\lambda_{\text{excitação}} = 335$  nm,  $\lambda_{\text{emissão}} = 450$  nm) para 7-hidroxicumarina em diferentes solventes, concentração de 7-hidroxicumarina  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

A variação nos valores de máximo nos espectros de emissão (Figura 3) ilustra a dependência da emissão em função do tipo de interação soluto/solvente que tem influência direta nos espectros de emissão. Essas interações também interferem no estado excitado de moléculas segundo a equação de Lippert-Mataga (equação 1).

$$\Delta \nu = \frac{2\Delta\mu^2}{cha^3} \Delta f \quad (1)$$

Onde  $\Delta\mu^2$  é a diferença entre os quadrados dos momentos de dipolo da molécula no estado fundamental e excitado,  $a$  é o raio de Onsager da cavidade formada ao redor da molécula,  $c$  é a velocidade da luz no vácuo, e  $h$  é a constante de Planck. A inclinação da reta depende da diferença do momento de dipolo da molécula antes e depois da excitação (OLIVEIRA et. al. 2003).

Para os sistemas (Figura 4),  $\Delta\mu^2 > 0$  para misturas água/acetonitrila, indicando que o momento de dipolo da molécula no estado excitado é um pouco maior que no estado fundamental. Para as misturas água/dioxano e água/etanol  $\Delta\mu^2 < 0$ , indicando que o momento de dipolo da molécula no estado excitado é um pouco menor que no estado fundamental. O deslocamento do Stokes tem uma grande dependência para misturas água/acetonitrila e dioxano, pois são solventes polares e não próticos e apolares respectivamente. No caso da mistura água/etanol, essa dependência é uma pouco menor. Este efeito pode ser atribuído à diminuição da polaridade dos solventes. A diminuição da polaridade do solvente aumenta a energia de ativação de conversão do estado excitado planar para um estado de transferência de carga intramolecular aumentando o rendimento quântico de fluorescência (OLIVEIRA et. al. 2003).

Por outro lado, um aumento da viscosidade impede a rotação interna dos grupamentos presentes nas moléculas dos corantes, resultando

num aumento da intensidade de fluorescência. Há ainda outro aspecto a ser considerado nas variações espectrais observadas, sendo este a presença de ligações hidrogênio entre a molécula da 7-hidroxicumarina e dos solventes. A 7-hidroxicumarina tem um grupamento OH que pode interagir com as moléculas de água das misturas de solventes.

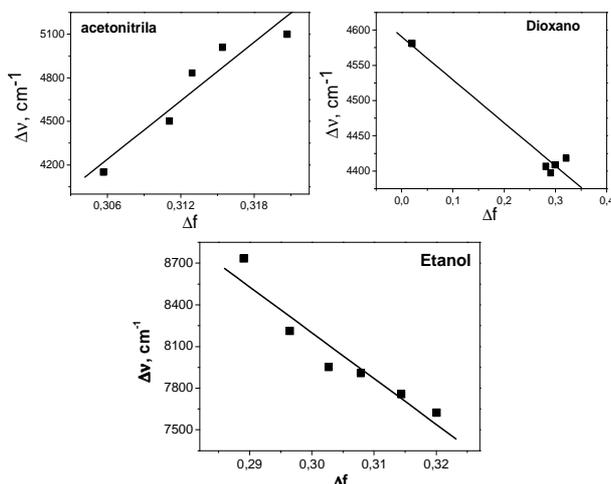


Figura 4 - Variação do deslocamento de Stokes em função do solvente para a 7-hidroxicumarina.

Assim, a variação do sinal de fluorescência em função da concentração de 7-hidroxicumarina foi avaliada em função da obtenção de uma curva analítica. Os espectros de fluorescência foram obtidos em meio aquoso.

Observou-se um aumento linear da intensidade relativa do sinal com a concentração de 7-hidroxicumarina no intervalo de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$  (Figura 5), com linearidade de 0,999. O limite de detecção,  $\text{LD} = 3S_b/b$  (SHABIR, 2003), obtido para a 7-hidroxicumarina foi de  $1,0 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$  ( $1,6 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Este valor indica a possibilidade para o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de 7-hidroxicumarina em fluidos biológicos utilizando a espectroscopia de fluorescência, pois de acordo com a farmacocinética, a cumarina é rapidamente absorvida e biotransformada em 7-hidroxicumarina (seu principal metabólito ativo). A concentração plasmática máxima de 7-hidroxicumarina após alguns minutos é de  $6,86 \mu\text{gL}^{-1}$ .

Novos estudos serão realizados para avaliar os possíveis interferentes no método (aminoácidos, sais, etc.) e este será validado para a quantificação de 7-hidroxicumarina em soro humano sintético.

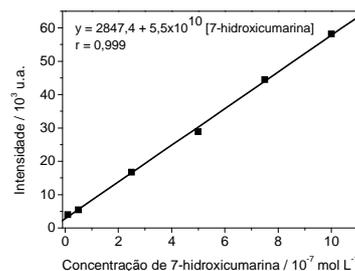


Figura 5: Curva Analítica obtida para a cumarina ( $\lambda_{\text{excitação}}$  de 335 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 450).

## Conclusão

A 7-hidroxicumarina apresentou máximos de excitação e emissão em 335 nm e 450 nm, respectivamente. O estudo em função do solvente mostrou a dependência das propriedades espectroscópicas da 7-hidroxicumarina com os solventes estudados (água, acetoneitrila, dioxano e etanol). Melhores resultados em termos de intensidade para a 7-hidroxicumarina foram obtidos em meio aquoso, isto provavelmente ocorre em função do grupamento OH que pode interagir com as moléculas de água das misturas de solventes. Estes resultados foram importantes para a obtenção da curva analítica para 7-hidroxicumarina. O limite de detecção obtido ( $1,6 \mu\text{gL}^{-1}$ ) indica que a espectroscopia de fluorescência pode ser adequado para a quantificação da 7-hidroxicumarina em fluidos biológicos.

## Referências

- DUFFY, C. F.; O'KENNEDY, R.; Determination of 7-hydroxycoumarin and its glucuronide and sulphate conjugates in liver slice incubates by capillary zone electrophoresis **J. Pharm. Biom. Anal.**, 17, p.1279-1284, 1998.
- ELINOS-BÁEZ, C. M.; LEÓN, F.; SANTOS, E.; Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines in vitro **Cell Biol. Internat.**, 28, p. 703-708, 2005.
- GAYATHRBI, R.; MANNEKUTLA, J. R.; INAMDARS. R.; J. MOL. STRUC., Effect of binary solvent mixtures (DMSO/water) on the dipole moment and lifetime of coumarin dyes DOI:10.1016/j.molstruc- 2008
- HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

- HOUSTON, P.; KODADEK T. Spectrophotometric Assay for Enzyme-Mediated Unwinding of Double-Stranded DNA; PNAS 1994; 91; 5471-5474 2007. DOI:10.1073/pnas.91.12.5471.

- OLIVEIRA, H. P. M. ; LEGENDRE, A. O. ; MACHULEK JUNIOR, A. ; GEHLEN, M. H. . Transferência de Energia entre Corantes Catiônicos em Sistemas Homogêneos. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 564-569, 2003.

- PEREIRA, B. M. R., GONÇALVES, L. C., PEREIRA, N. A., Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III. Atividade antidermatogênica. Congresso Brasileiro de Plantas Medicinais, Curitiba, 1992, Anais. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, pg. 1, 1992.

- RODRIGUES, RAFAELLA DA FONSECA. Extração da cumarina a partir das sementes da emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico / Rafaella da Fonseca Rodrigues --Campinas, SP: [s.n.], 2005. Disponível em <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000381835>

- SHABIR, G A. Validation of high-performance chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of The US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International conference on Harmonization. **J. Chrom. A**, 987, p. 57-66, 2003.