

EUGÊNIA ABRANTES DE FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE POLIAMINAS E INVESTIGAÇÃO
DA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM NAFTOQUINONAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**JOÃO PESSOA
2013**

EUGÊNIA ABRANTES DE FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE POLIAMINAS E INVESTIGAÇÃO
DA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM NAFTOQUINONAS**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

JOÃO PESSOA

2013

F475d Figueiredo, Eugênia Abrantes de.

*Desenvolvimento de método cromatográfico
para quantificação dos níveis de poliaminas e
investigação da formação de adutos com
naftoquinonas / Eugênia Abrantes de Figueiredo.-
João Pessoa, 2013.*

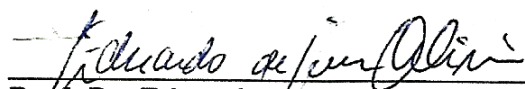
88f. : il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

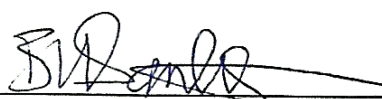
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE POLIAMINAS E
INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM
NAFTOQUINONAS

Aprovada em: 28 / 02 / 2013

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFPB - Orientador)



Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos (UFPB – Avaliador interno)



Profa. Dra. Ana Paula Barreto Gomes (UFRN – Avaliador externo)

Aos meus pais Afonso Eugênio de
Figueiredo e Francisca das Chagas
Abrantes de Figueiredo pelo
incentivo, dedicação, união e amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por guiar meus passos e abençoar essa longa jornada, jamais permitindo o desestímulo perante os obstáculos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela oportunidade de me tornar uma profissional habilitada, aumentando minhas perspectivas.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira pela confiança, competência, atenção e disponibilidade, me ajudando a aprimorar este trabalho.

A Coordenação da Pós-Graduação e as secretárias Tânia Maria Alves e Caroline Manguiera pela execução da parte burocrática deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, pelo apoio técnico e colaboração com seus conhecimentos e experiências instrumentais.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos ensinamentos recebidos.

A todos os meus colegas de mestrado e graduação e a todos aqueles que cruzaram o meu caminho durante essa jornada, amigos, que de alguma forma colaboraram para essa conquista, pelo companheirismo, pela solidariedade nas horas difíceis, e momentos de descontração.

As minhas irmãs Inara e Mariana pela amizade, carinho e apoio para vencer as dificuldades encontradas.

A Israel pelo companheirismo, cumplicidade e paciência, me auxiliando nos momentos mais difíceis.

A toda equipe do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Moleculares pela amizade construída, pela companhia e colaboração durante as longas jornadas de trabalho.

Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário.
(Albert Einstein).

RESUMO

Poliaminas são bases orgânicas alifáticas pertencentes às aminas bioativas que desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microrganismos. As mais importantes biologicamente são a espermidina [*N*-(3-aminopropil)-1,4-butano diamina ou aminopropil-tetrametilenodiamina] (SPD) e a espermina [*N,N'*-bis(3-aminopropil)-1,4-butano diamina ou diaminopropil-tetrametilenodiamina] (SPM). Estão intimamente envolvidas no crescimento e replicação de diversos tipos de células, e em especial encontra-se em altas concentrações em células exibindo crescimento rápido. É possível que substâncias tais como as naftoquinonas, que possam reagir com as poliaminas, tenham a capacidade de bloquear as suas funções pela depleção de sua concentração. A sua detecção direta é dificultada por não possuírem grupos que apresentam alta absorvidade molar. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método cromatográfico, utilizando detecção por fluorescência que possa ser aplicado a quantificação do nível celular de poliaminas em cultura de células tumorais com base nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão e investigar a formação de adutos com naftoquinonas. Para tanto derivatizou-se as poliaminas fora do sistema cromatográfico (pré-coluna) com cloreto de dansila, formando derivados dansilados que foram detectados por fluorescência (λ_{ex} = 365 nm; λ_{em} = 510 nm). A separação se deu por eluição em modo gradiente, utilizando como fase móvel metanol:água (35-95 v/v), uma coluna de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) a um fluxo de 1,0 mL/min, em 35 minutos. O método cromatográfico desenvolvido foi validado segundo o preconizado na Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e mostrou-se sensível, linear na faixa de concentração utilizada para SPD (97-970 pmol/mL) e para SPM (74-740 pmol/mL), preciso ($\leq 15\%$ para as concentrações média e alta; $\leq 20\%$ para a concentração baixa), exato para SPD (91-112%) e para SPM (92-119%), mostrando-se também seletivo (frente a separação das poliaminas e as proteínas presentes no meio de cultivo celular). O método desenvolvido foi ainda aplicado à análise das poliaminas incubadas com as naftoquinonas (lapachol e β -lapachona), e observou-se que a concentração dessas aminas foi depletada quando incubadas por 17 horas a temperatura ambiente com as naftoquinonas (diminuição de 67% e 50% dos níveis de SPD e SPM respectivamente quando incubadas com o lapachol; e diminuição de 44% e 37,5% de SPD e SPM quando incubadas com β -lapachona). Esses resultados mostram que o método desenvolvido é adequado para análise de poliaminas em cultura de células tumorais e que um provável mecanismo de ação antitumoral das naftoquinonas pode envolver a formação de adutos entre estas e as poliaminas.

Palavras-chave: poliaminas. cloreto de dansila. CLAE. naftoquinonas.

ABSTRACT

Polyamines are aliphatic organic bases belonging to the group of bioactive amines that have important metabolic and physiological functions in animals, plants and microorganisms. Amongst the most important polyamines biologically are spermidine [N-(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine or tetramethylene diamine-aminopropyl] (SPD) and spermine [N, N'-bis (3-aminopropyl)-1,4-butane diamine or diaminopropyl-tetramethylethylenediamine] (SPM). Polyamines are intimately involved in the growth and replication of many cell types, and it has been demonstrated that they are found in high concentrations in rapid growing cells. It is possible that substances such as naphthoquinones, which can react with polyamines have the ability to block its function by depleting its concentration. The direct detection of polyamines by HPLC with UV detection is hampered because they lack structural groups with high molar absorptivity. Thus, the objective of this study was to develop and validate a chromatographic method using fluorescence detection that could be applied for quantifying the cellular levels of polyamines in cell cultures based on the following parameters: selectivity, linearity, precision and accuracy. The polyamines were derivatized pre-column with dansyl chloride and were detected by fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) using a chromatographic method using gradient elution with a mobile phase consisting of methanol: water (35-95 v/v), a reversed-phase C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL/min., in 35 minutes. The chromatographic method was validated according to Resolution 899 recommended by the National Sanitary Agency of Brazil (ANVISA), and was linear in the concentration range used for SPD (0.0097 to 0.97 pmol/mL) and SPM (0.074 to 0.74 pmol/mL), precise ($\leq 15\%$ for medium and high concentrations, $\leq 20\%$ for the low concentration), exact for SPD (97-118%) and SPM (92-119%), It also showed selectivity (demonstrated by separation of polyamines and proteins present in cell culture medium). The developed method was also applied to the analysis of polyamines incubated with the naphthoquinones (lapachol and β -lapachone). The concentration of these polyamines was depleted when incubated for 17 hours at ambient temperature (decrease of 67% and 50% for SPD and SPM levels respectively when incubated with lapachol and a decrease of 44% and 37,5% for SPD and SPM when incubated with β -lapachone). These results demonstrate that the developed method is adequate for the analysis of polyamines in cell culture and that a probable mechanism of antitumoral action for the naphthoquinones may involve the formation of adducts with polyamines.

Keywords: polyamines. dansyl chloride. HPLC. naphthoquinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das aminas biotivas	21
Figura 2: Cristais observados por Antonie van Leeuwenhoek.....	22
Figura 3: Estrutura química das principais poliaminas de interesse biológico.....	23
Figura 4: Biossíntese das poliaminas	25
Figura 5: Estrutura molecular do lapachol (a). Estrutura molecular da β -lapachona (b)	28
Figura 6: Estrutura molecular do ortoftaldeído (a). Estrutura molecular da ninidrina (b).	32
Figura 7: Estrutura molecular da fluorescamina (a), do cloreto de dansila (b), do cloreto de benzoíla (c) e do clorofornato de 9-fluorenilmetila.....	33
Figura 8: Reação de derivatização de aminas com cloreto de dansila (Dns-Cl)	34
Figura 9: Fluxograma da reação de derivatização.....	43
Figura 10: Método gradiente metanol:água (60:95%) em 30 min.....	49
Figura 11: Cromatograma representativo da injeção do derivado fluorescente de SPD 990 pmol/mL eluído em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (60:95%) em 30 minutos.	50
Figura 12: Cromatograma representativo da injeção do derivado fluorescente de SPM 990 pmol/mL eluído em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (60:95%) em 30 minutos.	50
Figura 13: Método gradiente metanol:água (45:95%) em 50 min.....	51
Figura 14: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 970 pmol/mL e 740 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse ampliada (B).....	52
Figura 15: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 240 pmol/mL e 180 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).	52
Figura 16: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 97 pmol/mL e 74 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).	53
Figura 17: Método gradiente metanol:água (35:95%) em 35 min.....	54
Figura 18: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 970 pmol/mL e 740 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (35:95%) em 35 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).	54
Figura 19: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 240 pmol/mL e 180 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (35:95%) em 35 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).	55
Figura 20: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 480 pmol/mL e 370 pmol/mL, acrescidos de meio de cultura celular RMPI completo eluídos em modo gradiente com MEOH:H ₂ O (35:95%).....	67
Figura 21: Proposta mecanística para a formação do possível produto proveniente do acoplamento do lapachol com a espermidina.....	71
Figura 22: Proposta mecanística para a formação do possível produto proveniente do acoplamento da β -lapachona com a espermidina.	71

Figura 23: Método gradiente metanol:água (35-90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos.....	72
Figura 24: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 330 pmol/mL e 3190 pmol/mL em cultura de células tumorais HL-60 eluídos em modo gradiente com metanol:água (35-90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B)	73
Figura 25: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 66 pmol/mL e 913 pmol/mL em cultura de células tumorais HL-60 tratadas com 10 mM de β -lapachona eluídos em modo gradiente com Método gradiente metanol:água (35-90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B)	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Concentrações de espermidina e espermina utilizadas na reação de derivatização para obtenção da curva de calibração	42
Tabela 2: Condições cromatográficas finais do método desenvolvido para detecção de poliaminas que poderá ser aplicado a quantificação em cultura de células tumorais	44
Tabela 3: Áreas dos picos cromatográficos da primeira curva de calibração para SPD	56
Tabela 4: Áreas dos picos cromatográficos da primeira curva de calibração para SPM	56
Tabela 5: Áreas dos picos cromatográficos da segunda curva de calibração para SPD	57
Tabela 6: Áreas dos picos cromatográficos da segunda curva de calibração para SPM.....	57
Tabela 7: Áreas dos picos cromatográficos da terceira curva de calibração para SPD.....	58
Tabela 8: Áreas dos picos cromatográficos da terceira curva de calibração para SPM	58
Tabela 9: Média das três curvas de calibração obtidas para SPD no estudo da linearidade	59
Tabela 10: Média das três curvas de calibração obtidas para SPM no estudo da linearidade	59
Tabela 11: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPD no 1 ° dia	61
Tabela 12: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 1 ° dia	62
Tabela 13: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPD no 2 ° dia	63
Tabela 14: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 2 ° dia	63
Tabela 15: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPD no 3 ° dia	64
Tabela 16: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 3 ° dia	65
Tabela 17: Limite de Detecção e Quantificação calculados a partir da relação S/N	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 1º dia no intervalo das concentrações estabelecidas	56
Gráfico 2: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 2º dia no intervalo das concentrações estabelecidas	57
Gráfico 3: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 3º dia no intervalo das concentrações estabelecidas	58
Gráfico 4: Gráfico das três médias das curvas de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade	60
Gráfico 5: Gráfico de resíduos dos dados de linearidade	60
Gráfico 6: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 1º dia.....	62
Gráfico 7: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 2º dia.....	64
Gráfico 8: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 3º dia.....	65
Gráfico 9: Representação esquemática do estudo do acoplamento das amostras espermidina (SPD) e espermina (SPM) com o lapachol. $p < 0,05$ * vs. SPD sem lapachol e # vs. SPM sem lapachol.	70
Gráfico 10: Representação esquemática do estudo do acoplamento das amostras espermidina (SPD) e espermina (SPM) com a β -lapachona (BL). $p < 0,05$ * vs. SPD sem β -lapachona e # vs. SPM sem β -lapachona.	70
Gráfico 11: Representação esquemática do estudo do acoplamento de espermidina com β -lapachona em cultura de células (HL-60). $p < 0,001$ * vs. Controle	74
Gráfico 12: Representação esquemática do estudo do acoplamento de espermina com β -lapachona em cultura de células (HL-60). $p < 0,001$ * vs. Controle.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

λ : comprimento de onda
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18: Octadecilsilano
CG: cromatografia gasosa
CLAE: Cromatografia a Líquido de alta eficiência
CMD: concentração média determinada
CV: coeficiente de variação
DNA: ácido desoxirribonucleico
Dns-Cl: cloreto de dansila
DP: desvio padrão
DPR: desvio padrão relativo
FMOC: cloroformato de 9-fluorenilmetil
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
MS: espectrometria de massas
ODC: ornitina descarboxilase
OPA: o-ftaldialdeído
PUT: putrescina
RE: Resolução
RNA: ácido ribonucleico
SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilase
SPD: espermidina
SPM: espermina
TAP: transportador ativo de poliaminas
UV: ultravioleta
UV-VIS: Ultravioleta-visível

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Aminas Bioativas	20
2.2 Poliaminas.....	21
2.2.1 Definição e Breve Histórico	21
2.2.1 Biossíntese	23
2.2.2 Funções fisiológicas das poliaminas	26
2.2.3 Análogos das poliaminas e atividade antitumoral.....	27
2.3 Métodos cromatográficos e Detecção de Poliaminas.....	29
2.3.1 Derivatização.....	31
2.3.1.1 Derivatização pós-coluna	32
2.3.1.2 Derivatização pré-coluna.....	32
2.4 Padrão interno	34
2.5 Validação de Métodos Analíticos	35
2.5.1 Linearidade.....	35
2.5.2 Precisão	35
2.5.3 Exatidão	36
2.5.4 Seletividade.....	36
2.5.5 Limite de Detecção e Quantificação	36
2.6. Cultura de Células	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Amostras de poliaminas, naftoquinonas e cultura celular.....	40
4.2 Materiais e Equipamentos	40
4.3 Reagentes e Solventes	40
4.4 Preparo da amostra.....	41
4.4.1. Desenvolvimento da reação de derivatização e do método cromatográfico....	41
4.5 Validação do método cromatográfico	44
4.5.1 Linearidade.....	44

4.5.2 Precisão	44
4.5.3 Exatidão	45
4.5.4 Seletividade	45
4.5.5 Limite de Detecção e Quantificação	46
4.6 Aplicação do método cromatográfico para análise de poliaminas incubadas com naftoquinonas	46
4.7 Aplicação do método cromatográfico desenvolvido à análise de poliaminas em cultura de células tumorais tratadas com β -lapachona	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Desenvolvimento da reação de derivatização com cloreto de dansila e do método cromatográfico	49
5.2 Validação do método cromatográfico para quantificação de poliaminas em cultura de células tumorais	55
5.2.1 Linearidade	55
5.2.2 Exatidão e Precisão	60
5.2.3 Seletividade	66
5.2.4 Limite de detecção e quantificação	67
5.3 Aplicação do Método Cromatográfico para Análise de Poliaminas Ligadas a Naftoquinonas	69
5.4 Aplicação do método cromatográfico desenvolvido à análise de poliaminas em cultura de células tumorais tratadas com β -lapachona	72
6 CONCLUSÕES	76
7 PERSPECTIVAS	77
8 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Poliaminas são bases orgânicas alifáticas pertencentes à classe das aminas bioativas, estas desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas em todos os organismos vivos. Dessa forma, estão naturalmente presentes em baixas concentrações em animais, vegetais e microrganismos (GLÓRIA, 2005). Elas são essenciais para o crescimento e diferenciação celular e suas concentrações intracelulares aumentam durante períodos de rápida proliferação celular (LOZANOV *et al.*, 2007).

Estudos relatam que as poliaminas estão presentes em concentrações mais altas em células tumorais que em células normais. O aumento dos níveis de

poliaminas, como observado em cânceres humanos, são o resultado da desregulamentação do metabolismo e transporte de poliaminas (THOMAS; THOMAS, 2003; SCALABRINO; FERIOLI, 1985). O seu teor em urina, soro e fluido cerebroespinal de pacientes com câncer é geralmente superior ao valor normal (YUN; ZHANG, 1987). Consequentemente, a biossíntese de poliaminas, degradação, e as vias de transporte têm sido exploradas como alvos potenciais para a prevenção e terapêutica contra o câncer (TANG; KIM; FEITH, 2004; PEGG *et al.*, 2003; COLEMAN *et al.*, 2002; FEITH; SHANTZ; PEGG, 2001). Deste modo, são um alvo importante para drogas anticâncer (CUNHA *et. al*, 2006).

Um alvo pertinente para as substâncias com atividade tumoral é o transportador ativo de poliaminas (TAP), uma proteína encontrada em grande quantidade nos tecidos em rápido desenvolvimento e responsável pela captação de poliaminas exógenas. Entre os inibidores desta via encontram-se os análogos estruturais das poliaminas, especialmente os conjugados de amins com núcleos aromáticos ou sistemas cíclicos, como por exemplo, conjugados de amins sintetizadas a partir da união do núcleo naftoquinona de derivados naturais e sintéticos (lapachol, nor-lapachol e lausona), compostos com atividade antitumoral já conhecido (CUNHA *et. al*, 2006; ESTEVES-SOUZA *et. al.*, 2008).

É possível que substâncias que possam reagir com as poliaminas tenham a capacidade de bloquear as suas funções pela depleção de sua concentração, ou que os produtos assim formados, dada a similaridade estrutural com as poliaminas, possam vir a apresentar a capacidade de agirem como análogos das poliaminas, neste caso funcionando como conjugados, ou inibindo competitivamente ou não os sítios de ação das poliaminas (YATIN, 2002).

Um estudo realizado por Santos e colaboradores (2011) demonstrou que as naftoquinonas podem reagir com amins alifáticas primárias à temperatura ambiente e fornecer adutos com bons rendimentos (52 a 88%). Tal resultado leva ao desenvolvimento de uma hipótese de que as naftoquinonas possam se complexar com as poliaminas e consequentemente depletar seus níveis celulares. Muitas das pesquisas envolvendo poliaminas são realizadas em culturas celulares. A cultura celular é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou: humano, vegetal ou animal. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula permitindo importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, a

produção de vacinas e a biologia da célula tumoral (AMARAL; MACHADO-SANTELLI *et. al.*, 2011), crescimento e diferenciação celular (COOPER, 2007).

O primeiro relato de análise de poliaminas em material biológico por Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência foi publicado em 1976 por Samejima e colaboradores, que usaram um procedimento de detecção a base de fluorescamina. Depois disso, numerosos métodos têm sido descritos usando agentes derivatizantes como: o-ftaldialdeído (OPA), cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC), cloreto de benzoíla e cloreto de dansila (Dns-Cl). (EKEGREN; GOMES-TROLIN, 2005). Comparado ao uso do OPA, o DNS-Cl, apresenta algumas vantagens, incluindo a capacidade deste reagente derivatizar não só as amins primárias, mas também amins secundárias, Além disso, tem sido relatado que derivados dansila são mais estáveis do que os obtidos com OPA (PASEIRO-CERRATO *et. al.*, 2011).

Apesar de ser uma técnica bastante utilizada, o método de CLAE encontra uma limitação, uma vez que muitos dos compostos de interesse não possuem grupos cromóforos ou fluoróforos o que dificulta a sua detecção, fazendo-se necessário um passo experimental adicional, como por exemplo, a derivatização, que é uma técnica capaz de aumentar a sensibilidade e/ou seletividade. Compostos contendo grupos funcionais tais como amins e sem grupos cromóforos são um tipo de analito que requererem derivatização para sua determinação por CLAE utilizando detectores por ultravioleta ou fluorescência (SILVA, 2005).

Esse tipo de reação pode ser realizada de duas maneiras: pré-coluna e pós-coluna. No primeiro caso a reação de derivatização é realizada manualmente antes da injeção no cromatógrafo líquido, já a segunda é conseguida automaticamente pela adição de um reagente de derivatização após a separação, e antes de detecção, por meio de uma segunda bomba no equipamento (ANALYTIX, 2002). Uma das vantagens da derivatização pré-coluna é que a configuração do instrumento de trabalho é mais simples, além de consumir menos reagente (SHIMADZU, 2011).

A validação de métodos para fins de quantificação é normatizada pela Resolução RE nº. 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicada no Diário Oficial da União em 29 de maio de 2003, que determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” e estabelece que um método para ser validado deve apresentar precisão, exatidão,

linearidade, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade adequada à análise, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

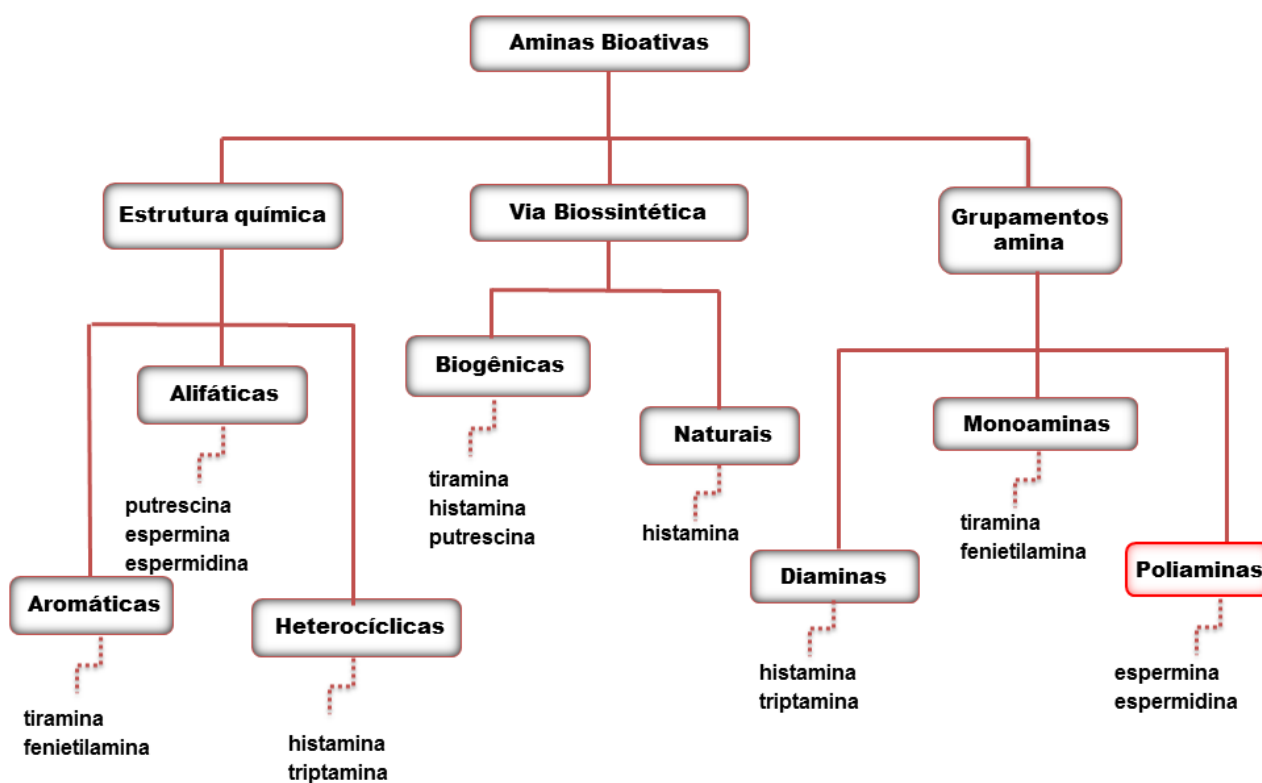
Diante o exposto, o desenvolvimento e validação de método cromatográfico com detecção por fluorescência para fins de quantificação dos níveis de poliaminas biologicamente relevantes em cultura de células tumorais; permitirá a determinação das mesmas com maior seletividade, sensibilidade e confiabilidade, além de permitir correlacionar a depleção dos estoques intracelulares de poliaminas por meio de acoplamento com compostos que apresentem atividade antitumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aminas Bioativas

Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular, produzidas por meio do metabolismo normal de animais, plantas e microrganismos, que participam de importantes funções metabólicas e fisiológicas de organismos vivos e podem ser classificadas com base no número de grupos amino, estrutura química, ou biossíntese (figura 1).

Figura 1: Classificação das aminas biotivas



Fonte: LUSTOSA, C.F, 2011

2.2 Poliaminas

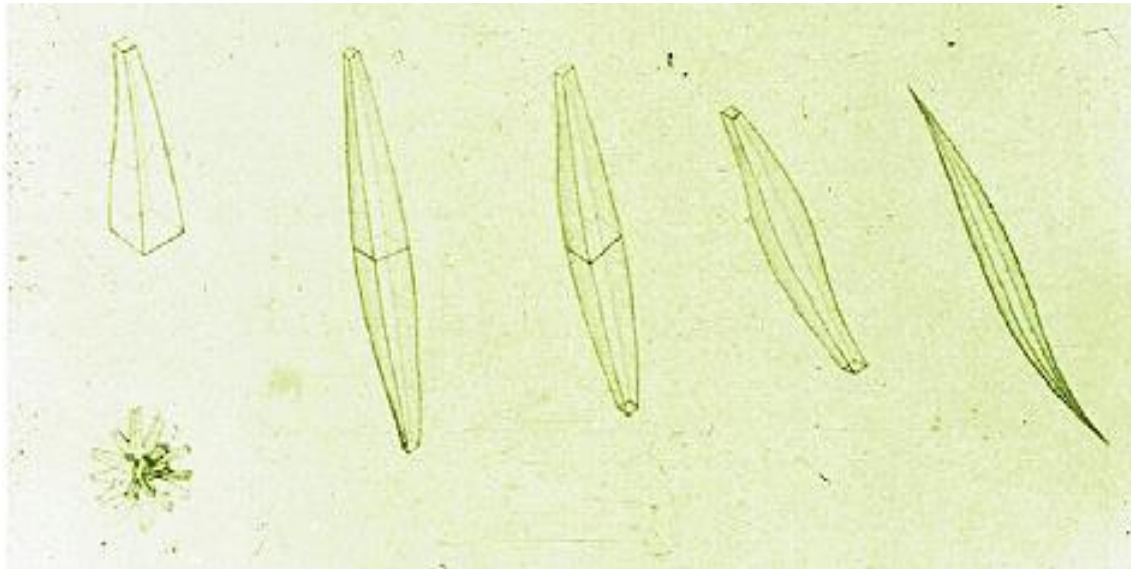
2.2.1 Definição e Breve Histórico

Poliaminas tal como o nome indica, são constituídas por dois ou mais grupos amino primários (NH_2). São compostos fortemente catiônicos, e, assim, uma das suas principais características é a de interagir com moléculas carregadas negativamente, tais como DNA, RNA ou proteínas. Elas são sintetizadas praticamente em todas as células de animais, plantas e bactérias (SCALABRINO; FERROLI, 1984; MINOIS; CARMONA-GUTIERREZ; MADEO, 2011) e são importantes para o crescimento renovação e metabolismo de todos os órgãos do corpo (KAROVICOVA; KOHAJDOVA, 2005).

A descoberta das poliaminas ocorreu há mais de 330 anos, em 1678, quando Antonie van Leeuwenhoek identificou substâncias cristalinas no sêmem humano (figura 2) cuja estrutura recebeu o nome de espermina (SPM) (figura 3), por

Ladenburg e Abel em 1888 (BACHRACH, 2010; MINOIS; CARMONA-GUTIERREZ; MADEO, 2011), entretanto a estrutura correta só foi determinada mais de 200 anos depois por Rosenheim em 1924 (BACHRACH, 2010; SAWHNEY, 1990).

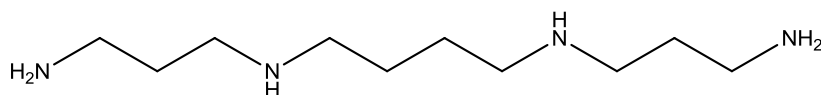
Figura 2: Cristais observados por Antonie van Leeuwenhoek



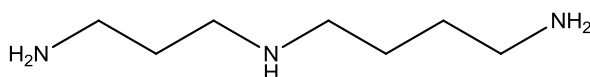
Fonte: BACHRACH, U. 2010

Subsequentemente uma triamina (espermidina) (SPD) (figura 3) e uma diamina (putrescina; 1,4-diaminobutano) (PUT) (figura 3) foram isoladas a partir de sistemas procarióticos e eucarióticos. Logo se tornou evidente a importância biológica das poliaminas, o que estimulou a pesquisa em muitas áreas e uma explosiva proliferação científica desde a década de 70 (BACHRACH, 2010; MINOIS; CARMONA-GUTIERREZ; MADEO, 2011; TABOR; TABOR, 1976).

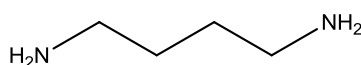
Figura 3: Estrutura química das principais poliaminas de interesse biológico



Espermina



Espermidina



Putrescina

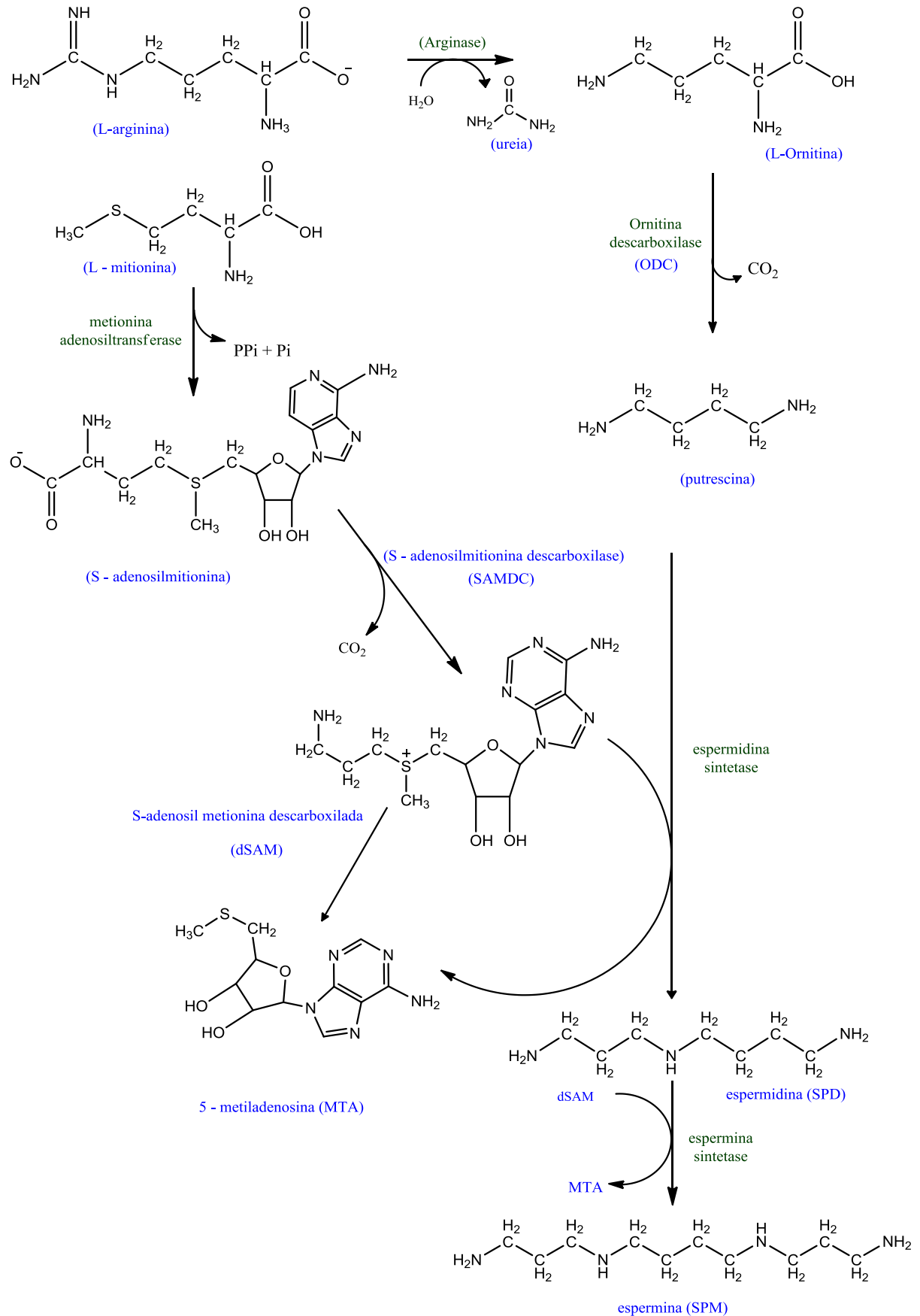
2.2.1 Biossíntese

O interesse pelo mecanismo da biossíntese de poliaminas tem crescido nos últimos anos, uma vez que este fornece informações cruciais para o desenvolvimento de inibidores que podem ser usados como agentes farmacológicos (ARAÚJO, 1995). Minois *et al.* (2011) relatam que as poliaminas existem nos organismos através de três fontes: ingestão direta por meio da dieta, além da síntese e liberação por bactérias residentes no trato gastrointestinal e biossíntese *in situ* a partir de aminoácidos. Nos microrganismos e nas plantas superiores as poliaminas são produzidas a partir da agmatina originada pela descarboxilação da arginina. Já nas espécies cujas células não contêm a enzima arginina descarboxilase, tais como os mamíferos, e eucariontes inferiores o principal caminho para a formação das poliaminas é a via da ornitina descarboxilase (ARAÚJO, 1995; KALAC, 2005).

Todas as células eucariotas sintetizam putrescina, espermina e espermidina (KHUHAWAR; QURESHI, 2001), elas são sintetizadas na fase G1 do ciclo celular (RAMOT *et al.*, 2010). A biossíntese pode ser dividida em duas etapas: síntese da diamina putrescina e formação de SPD e SPM resultante da adição de um grupo propilamino ao precursor PUT (PALAVAN-ÜNSAL, 1995; URDIALES; MEDINA; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2001). O mecanismo de biossíntese de 1-4 diaminobutano e

espermidina foi primeiramente estabelecido em microrganismos e posteriormente foi encontrado ser bastante semelhante em células animais (TABOR; TABOR, 1976).

Os principais precursores das poliaminas são os aminoácidos L-ornitina e L-metionina (KHUHAWAR; QURESHI, 2001). A biossíntese (figura 4) se dá a partir da descarboxilação da L-ornitina pela ornitina descarboxilase (ODC) formando putrescina (KHUHAWAR; QURESHI, 2001; TABOR; TABOR, 1976). Por sua vez, a ornitina, usada como substrato da ODC na produção de putrescina, pode ser proveniente do plasma ou produzida intracelularmente por ação da arginase sobre a arginina (MORGAN, 1987). Para que ocorra a conversão de PUT em SPD e esta em SPM, uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente. A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) e, pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), forma a S-adenosil metionina descarboxilada, fornecendo um grupo propilamina à PUT formando a SPD, pela espermidina sintase, e, o mesmo grupamento à SPD formando a SPM, pela espermina sintase (URDIALES; MEDINA; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2001; MATTOO *et al.*, 2010).

Figura 4: Biossíntese das poliaminas

2.2.2 Funções fisiológicas das poliaminas

Existem mais de 1500 trabalhos com experiências em diversos sistemas *in vitro* que relatam as funções e importância das poliaminas (JÄNNE *et al.*, 2004). Embora um grande número de estudos tenham demonstrado que as poliaminas são cruciais para o crescimento e proliferação de células de mamíferos, as funções celulares destes compostos são ainda pouco conhecidas. Entretanto, muitos pesquisadores concordam que os efeitos das poliaminas podem estar completamente relacionados à estimulação da síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Uma parte importante de suas funções celulares pode ser explicada através de uma modificação estrutural do RNA que ocorre nas concentrações fisiológicas de Mg^{2+} e K^{1+} porque a maioria das poliaminas existe em um complexo de poliamina-RNA no interior das células (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; SAUNDERS; WALLACE, 2007; PEEG; FEITH, 2007).

Em pH fisiológico, essas moléculas são positivamente carregadas no grupamento amino primário e secundário e apresentam valores de pKa entre 8 e 10 (BONCHER *et al.*, 2007). Sendo assim, no meio biológico, as poliaminas podem agir como ligantes em múltiplos sítios do DNA, RNA, proteína, fosfolipídios e nucleotídeo trifosfato e enquanto algumas dessas interações podem ser puramente eletrostáticas e facilmente substituídas por cátions inorgânicos, outras são específicas para o comprimento da cadeia carbônica alifática (WALLACE; FRASER; HUGHES, 2003; SEILER, 2005).

Consequentemente, no que se refere às funções fisiológicas das poliaminas podemos classificar o seu desempenho como um segundo mensageiro, regulador de muitas enzimas presentes na membrana celular, incluindo a adenilato ciclase, transglutaminase e também alguns canais iônicos; nutriente metabólico, fatores de crescimento, antioxidante, prevenindo a oxidação lipídica; DNA, RNA e estabilizador de membrana (WALLACE, 2000; LAGISHETTY; NAIK, 2008).

Dentre os diversos papéis que as poliaminas exercem, a implicação das mesmas na progressão de câncer e apoptose tem sido bastante pesquisada (KHUHAWAR; QURESHI, 2001; HAWEL; BYUS, 2002). Numerosos estudos tem demonstrado que em células cancerígenas os níveis dessas aminas são mais elevados que em células normais, podendo sua determinação ser útil como

marcador tumoral. Uma vez que as poliaminas são essenciais para o crescimento celular, a capacidade aumentada de síntese dessas moléculas pode refletir a progressão do tumor. Os pacientes que possuem concentrações elevadas, seja no sangue ou na urina, são considerados de pior prognóstico quando comparados àqueles com níveis baixos (KUBOTA *et al.*, 1985; UEHARA *et al.*, 1980; WEISS *et al.* 2002; LINSALATA, 2002).

Ao lado do papel das poliaminas em eventos ligados a proliferação celular, essas aminas também tem sido implicadas na apoptose, que se trata de um processo de morte celular fisiológico regulado por mecanismos genéticos e é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas das células (NITTA; IGARASHI; YAMAMATO, 2002). Os teores desses polícatíons mudam durante o ciclo celular, devido a alterações nas enzimas biossintéticas ODC e SAMDC, e essa variação poderá resultar na parada do crescimento celular (PIGNATTI *et al.*, 2004).

Por conseguinte, as enzimas biossintéticas e catabólicas, sistemas de transporte, e a desregulação da homeostase por análogos estruturais das poliaminas tem-se tornado um alvo significativo na terapia contra o câncer; resultados impressionantes têm sido obtidos em cultura de células e até mesmo em modelos animais portadores de tumor (JÄNNE *et al.*, 2004; CRISS, 2003; SEILER, 2003).

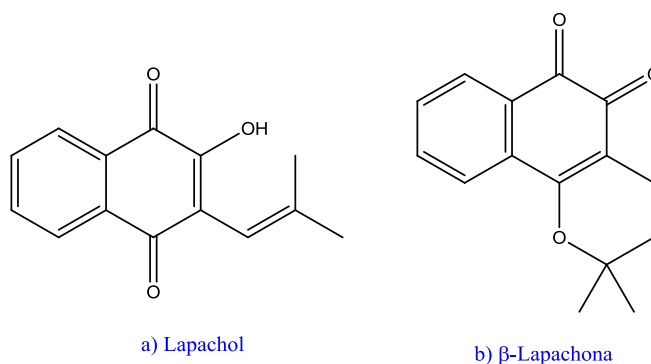
2.2.3 Análogos das poliaminas e atividade antitumoral

Apesar de todos os avanços tecnológicos e esforços, o tratamento contra o câncer ainda é um desafio e casos de cura são escassos. Os produtos naturais e modificações químicas nas drogas antitumorais são uma alternativa importante na busca de novas drogas antineoplásicas (ESTEVEZ-SOUZA *et al.*, 2008). Atualmente o método mais investigado se baseia na inibição do tumor por análogos estruturais citotóxicos de poliaminas (CUNHA *et al.*, 2006).

As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser tóxicas para as células, muitas drogas antitumorais clinicamente importantes, contém um grupo quinona, como parte relevante de sua estrutura, tais como daxorrubicina e mitomicina C (BONIFAZI *et al.*, 2006). A citotoxicidade das naftoquinonas está relacionada com a inibição de topoisomerases e apoptose (DUBIN, 2001). Lapachol (figura 5 a) é uma naftoquinona natural obtido da *Tabebuia*

avellanedae, a partir do qual podem ser alcançados derivados lapachona (ALMEIDA, 2009). Um dos derivados mais estudados é a β -lapachona (figura 5 b), proveniente da ciclização ácida do lapachol e com potencial atividade antineoplásica contra vários tipos de linhagem celulares, como por exemplo, a inibição da proliferação e indução de apoptose em células do retinoblastoma (ARAUJO *et al.*, 2012; DUVOIX *et al.*, 2004; KUMI-DIAKA *et al.*, 2004; SHAH *et al.*, 2008). Embora o lapachol e seus derivados exerçam alguns efeitos benéficos, não são de nenhuma maneira drogas anticancerígenas perfeitas. Não obstante a ausência de significativa toxicidade, mesmo em doses elevadas, as concentrações plasmáticas são muito baixa para demonstrar um efeito terapêutico. Entretanto devido à sua atividade antitumoral, é um candidato ideal para uma modificação sistemática para eventualmente, desenvolver análogos com atividade melhorada e perfil farmacocinético.

Figura 5: Estrutura molecular do lapachol (a). Estrutura molecular da β -lapachona (b)



Estudos têm demonstrado que a união de compostos citotóxicos (naftoquinonas), tal como o lapachol, com poliaminas é capaz de aumentar a atividade antineoplásica em relação aos compostos de partida. Esses análogos de poliaminas, devido à similaridade estrutural, podem competir com as poliaminas naturais pelo sítio de ligação nas células, ou ainda facilita a sua entrada nas células tumorais que possuem um sistema de captação de poliaminas e aumenta sua seletividade ao DNA (DELCROS *et al.*, 2002; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007).

2.3 Métodos cromatográficos e Detecção de Poliaminas

A técnica cromatográfica foi aplicada pela primeira vez em 1906 por Mikahail Tswett, para separação de pigmentos de plantas utilizando um tubo de vidro vertical. Devido às bandas coloridas que surgiram horizontalmente na coluna de vidro, originou-se o termo cromatografia (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A cromatografia é um método de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura, no qual os elementos a serem separados distribuem-se em duas fases: uma estacionária e outra móvel. E isso ocorre a depender da interação entre o analito e essas fases, que se dá devido à afinidade físico-química que o mesmo terá por uma ou outra (PERES, 2002).

Diversos são os critérios para classificar os diferentes métodos cromatográficos, sendo alguns deles: a forma física do sistema cromatográfico, que pode ser subdividida em planar e coluna; a fase estacionária que pode ser sólida, líquida ou quimicamente ligada e a fase móvel que pode ser dividida em gasosa, supercrítica e líquida, que por sua vez ainda apresenta uma subdivisão: a clássica, na qual a fase móvel (líquido) é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, enquanto que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza fases estacionárias de partículas menores, fazendo-se necessário à utilização de uma bomba de alta pressão para que a eluição da fase móvel seja realizada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; BRAITHWAITE; SMITH, 1996).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem como característica a utilização de colunas empacotadas com suportes a base de sílica pelicular, que possui diâmetros de 3-5 μm , o que garante uma elevada área superficial para a fase estacionária fazendo-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido à baixa permeabilidade, proporcionando assim uma elevada eficiência de separação. Ela pode ser de fase normal ou reversa, de acordo com o grau de polaridade da fase estacionária e móvel, sendo o método de fase reversa o mais empregado. Durante o processo os componentes migram com velocidades diferentes e são identificados à saída da coluna em um detector que fornece um registo contínuo da composição da amostra analisada, obtendo-se um gráfico chamado de cromatograma. A escolha do detector depende das propriedades do analito em estudo; vários são disponíveis: ultravioleta (UV/VIS), fluorescência, arranjo de diodos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011; KAZAKEVICH;

LOBRUTTO, 2007). Essa técnica é um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, devido a sua adaptabilidade para determinações com boa sensibilidade, versatilidade e confiabilidade em várias áreas da ciência (TONHI *et al.*, 2002).

A concentração de amins biogênicas em tecidos é, com raras exceções, baixa, ou seja, menor que 10 nmoles por grama de tecido. A possibilidade de alcançar determinações quantitativas de picomoles e até mesmo fentomoles (YUN; ZHANG, 1987) de amins estimulou a melhoria e sensibilidade dos métodos (SEILER; KNODGEN, 1977).

Vários métodos cromatográficos têm sido relatados na literatura para separação e determinação de poliaminas em diversos tipos de amostras (BELLAGAMBA *et al.*, 1997A); cromatografia de troca iônica (GEHRKE *et al.*, 1974), cromatografia em camada delgada (SEILER; KNODGEN, 1977; LIN; LAI, 1982), cromatografia gasosa (CG) (VAN DEN BERG; KINGMA; MUSKIET, 1987), espectrometria de massas (STEVENS *et al.*, 2010) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta e fluorescência (KOSKI *et al.*, 1987; MINOCHA; MINOCHA; ROBIE, 1990; HUI-MING MAO, 2009; DE MEY *et al.*, 2012; SETHI, 2011).

A cromatografia em camada delgada é o método mais simples. Poliaminas livres ou seus derivados colorimétricos ou fluorescentes são analisados em placas de celulose ou ácido silícico e misturas de solventes comuns como ciclohexano e acetato de etila podem ser utilizados na separação (SEILER; KNODGEN, 1977; SHALABY, 1995), entretanto tem sido substituída por técnicas mais sensíveis (BELLAGAMBA *et al.*, 1997).

De acordo com Mengerink (2005), a cromatografia gasosa não é tão utilizada para determinação de poliaminas em amostras biológicas, visto que, a introdução da amostra no cromatógrafo é complicada, além disso, a presença de contaminantes não polares em todos os tipos de amostras biogênicas fazem com que a CG não seja o método de primeira escolha para sua análise. Todavia, há relatos de que o uso de CG para detecção de poliaminas em amostras biológicas vem aumentando gradualmente, devido a sua alta capacidade de resolução juntamente com sistemas de detecção mais sensíveis, como detector de captura de elétrons (RATTENBURY *et al.*, 1979). Já a espectrometria de massas (MS) tem sido

utilizado para a detecção de poliaminas ou em combinação com CLAE ou GC (HAKKINEN *et al.*, 2007).

Todos esses métodos podem ser usados para monitorar as alterações nos teores de poliaminas a partir de tecidos biológicos, uma vez que a mudança nos níveis dessas substâncias pode indicar um estado de doença; sendo CLAE em fase reversa com detecção por fluorescência o método de escolha mais comum e mais sensível (SETHI, 2011; SAEKI; UEHARA; SHIRAKAWA, 1978). O método de detecção por fluorescência apresenta como vantagem uma alta sensibilidade para grupos seletivos de determinados compostos com limites de detecção na faixa de 10 fentograma (fg). Neste método é utilizado um comprimento de onda específico para excitar as moléculas do analito, estas absorvem energia ($h\nu$) e em seguida emitem um sinal luminoso (fluorescência). A intensidade dessa luz emitida é então monitorada para quantificar a concentração do analito (SKOOG *et al.*, 2005).

A detecção de poliaminas por CLAE com detecção por fluorescência é uma operação analítica de acentuado grau de limitação devido fundamentalmente essas aminas não possuírem grupos fluoróforos que possibilitem a absorção de energia e consequentemente a fluorescência o que dificulta a sua detecção, fazendo-se necessário um passo experimental adicional, como por exemplo, a derivatização, que é uma técnica capaz de aumentar a sensibilidade e/ou seletividade das poliaminas (SILVA, 2005; DUCROS *et al.*, 2009; MUSKIET *et al.*, 1995).

2.3.1 Derivatização

A derivatização é uma técnica que transforma um composto químico em um produto de estrutura química similar, derivado. Geralmente, um grupo funcional específico da substância em questão é alvo da reação de derivatização. O derivado obtido possui propriedades diferentes da que inicialmente tinha e as novas características resultantes podem facilitar processos de quantificação, separação entre outros (KNAPP, 1979).

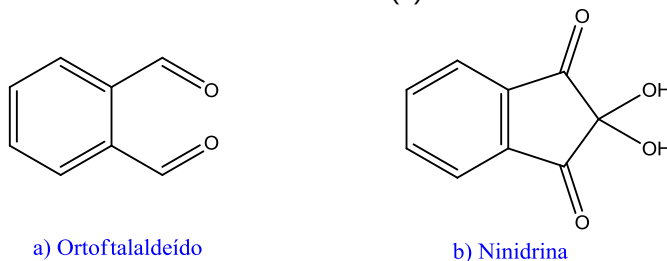
O processo de derivatização em CLAE pode ser realizado de duas maneiras: pré-coluna e pós-coluna. De acordo com Frei e Santi (1975), a primeira acontece antes da separação, ou seja, ela é realizada adicionando-se o reagente derivatizante manualmente antes da injeção no cromatógrafo e a segunda é conseguida automaticamente pela adição de um reagente de derivatização após a

separação, e antes de detecção, por meio de uma segunda bomba no equipamento, onde o fluxo contínuo permite a mistura do reagente derivatizante com o eluente.

2.3.1.1 Derivatização pós-coluna

Nem sempre a derivatização pré-coluna atende as exigências dos problemas de análise, e uma alternativa é a derivatização pós-coluna (ZHU; KOK, 1998). Esse modo de operação não é suscetível à formação de interferentes, a reação pode ser automatizada, e pode alcançar notável capacidade de quantificação e reprodutibilidade, entretanto consome bastante reagente de derivatização e variedade do mesmo é limitada (DANIELSON, 2000). Sánchez e Ruiz-Capillas (2012) otimizaram um método cromatográfico com derivatização pós coluna para separação de aminas biogênicas em amostras de peixe utilizando ortoftalaldeído (OPA) como reagente derivatizante. Para detecção de aminas biogênicas também pode ser usado como reagente derivatizante pós-coluna, ninidrina (SIMON-SARDAKI; HOLZAPFEL, 1994).

Figura 6: Estrutura molecular do ortoftalaldeído (a). Estrutura molecular da ninidrina (b).



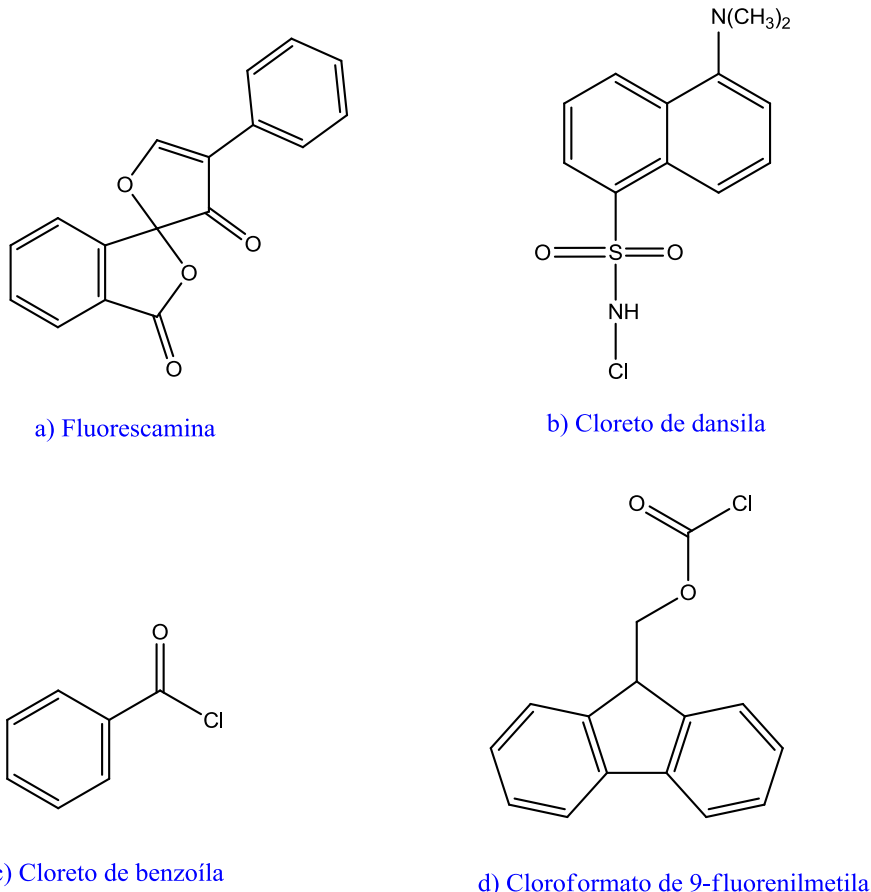
2.3.1.2 Derivatização pré-coluna

Esse processo permite condições de trabalho mais flexíveis, como sistema de solvente necessário para separação, tempo de reação, eliminação do excesso de reagente, configuração do equipamento simplificada, consumo de menos reagente; por outro lado, existe sempre a possibilidade da formação de artefatos e afetar a quantificação dos resultados (WERRINGLOER, 2001).

Vários reagentes de derivatização são relatados na literatura para detecção de poliaminas, ortoftalaldeído (OPA) (VENZA *et al.*, 2001), fluorescamina (INGLES; GALLIMORE, 1985), cloreto de dansila (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sufonil) (Dns-Cl) (MINOCHA; MINOCHA; ROBIE, 1990), cloreto de benzoíla (OEFNER;

WONGYAI; BONN, 1992), cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) (EKEGREN; GOMES-TROLIN, 2005).

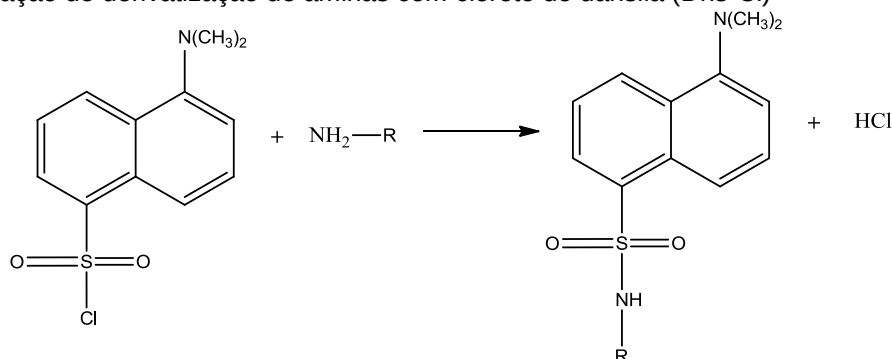
Figura 7: Estrutura molecular da fluoescamina (a), do cloreto de dansila (b), do cloreto de benzoíla (c) e do cloroformato de 9-fluorenilmetila



Apesar dos dois primeiros reagentes citados acima serem mais seletivos, a sua utilização tem sido limitada, uma vez que formam produtos instáveis e formam derivados apenas com aminas primárias e secundárias, ao contrário dos cloretos de ácidos que além desses ainda reagem com nitrogênios imidazólicos, grupos hidroxifenólicos eté mesmo com alguns alcóois (SEILER, 1986).

A derivatização pré-coluna com Dns-Cl, é econômica, pode ser utilizada com sucesso para quantificação de poliaminas e reage com aminas primárias e secundárias, formando derivados fluorescentes relativamente estáveis (figura 6) (MNOCHA; LONG, 2004; LINARES *et al.*, 1998; KHUHAWAR; QURESHI, 2001). A reação é normalmente alcançada em pH alcalino (8-10) e o reagente deve ser aplicado em excesso a fim de garantir uma reação quantitativa com todos os grupamentos amina das poliaminas, haja vista que podem ser obtidos resultados insatisfatórios quando o reagente é insuficiente (SEILER, 1986).

Figura 8: Reação de derivatização de aminas com cloreto de dansila (Dns-Cl)



Fonte: HERNANDÉZ-BORGES *et. al*, 2007

2.4 Padrão interno

A utilização de padrão interno durante o desenvolvimento de método analítico tem sido proposta como uma estratégia para minimizar erros aleatórios e sistemáticos, permitindo análises quantitativas com maior precisão (LOWES *et al.*, 2011; CORREIA, 2004) .

O padrão interno é uma substância que apresenta características semelhantes àsquelas do analito, mas que pode ser quantificada separadamente e seu comportamento durante a análise deve ser similar ao do analito. O padrão interno é adicionado às amostras para compensar, minimizar ou corrigir as falhas associadas às variações dos parâmetros instrumentais, experimentais e efeitos provocados pela matriz; como por exemplo, perdas na preparação da amostra, na extração, nas quantidades injetadas, diferentes analistas (CORREIA, 2004; LIGIERO *et al.*, 2009, UNICORN, 2001).

Na escolha de um composto como padrão interno deve-se observar que o pico referente ao padrão esteja bem resolvido dos demais picos dos componentes da amostra e elua próximo ao sinal do analito. O padrão interno deve, ainda, ser altamente puro, não reagir com nenhum dos componentes da amostra, não deve estar presente naturalmente na amostra e precisa ser quimicamente similar ao analito de interesse.

2.5 Validação de Métodos Analíticos

A validação é definida como um ato documentado que atesta se qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados (MARINHO, 2008). Segundo a Resolução-RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, que determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar os seguintes parâmetros, definidos por esta resolução: linearidade, precisão e exatidão, especificidade e seletividade, robustez, limite de detecção e de quantificação.

2.5.1 Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo estabelecido. É determinada pelo coeficiente de correlação (r), sendo adotado como critério mínimo aceitável um valor maior ou igual a 0,99.

2.5.2 Precisão

Determina a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta se divide em três níveis: repetibilidade (precisão intracorrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

A repetibilidade ou precisão intra-corrída avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada com, no mínimo nove determinações, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada ou o mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste.

A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) é concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. Para métodos bioanalíticos o desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

2.5.3 Exatidão

Mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. É determinada a partir de no mínimo nove determinações, contemplando três concentrações, uma baixa, uma média e uma alta. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

2.5.4 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, ou seja, produz respostas para um analito alvo distinguindo-o de todas as outras respostas (BRASIL, 2003).

2.5.5 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção, segundo a RE 899, é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, porém não necessariamente quantificada, sob condições

experimentais estabelecidas. Com métodos instrumentais como CLAE a estimativa do limite de detecção também pode ser feita com base na relação 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LD = DP_a \times \frac{3}{IC}$$

em que DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração.

Ainda de acordo com RE 899, entende-se por limite de quantificação a quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

$$LD = DP_a \times \frac{10}{IC}$$

em que DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração. Também pode ser determinado por meio do ruído, considerando a concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

2.6. Cultura de Células

O cultivo de células teve início no princípio em 1907, quando Harrison tentou provar que as fibras nervosas eram formadas a partir de células nervosas, mimetizando as condições básicas necessárias de sobrevivência de uma célula, bem como a manutenção de um ambiente asséptico. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. O seu uso como modelo experimental é vantajoso, uma vez que permite o controle do ambiente, a homogeneidade da amostra e economia, ao se comparar com o uso de animais (ALVES; GUMARÃES, 2010).

A cultura celular é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou: humano, vegetal ou animal. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula permitindo importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, a produção de vacinas e a biologia da célula tumoral (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011), crescimento e diferenciação celular (COOPER, 2007).

Um fator importante que influencia o crescimento das células em cultura é a escolha do meio de cultivo celular. Comercialmente disponível o meio pode ser obtido na forma de um líquido estéril pronto para o uso ou na forma de pó. Além de proporcionar nutrientes (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais), hormônios e gases para o crescimento celular, o meio é geralmente suplementado com antibióticos e/ou fungicidas para inibir a contaminação (PHELAN, 1998). A maioria das linhagens celulares podem crescer usando Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) ou RPMI 1640, que é uma abreviação para Rosewell Park Memorial Institute como meios de cultura (BARFORD, 1995).

Baseado na premissa de que as poliaminas estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular muitos estudos tem sido realizados, utilizando cultura de células como modelo experimental (HAWEL; BYUS, 2002; NEWTON; OHNO; ABDEL-MONEM, 1976; WEISS *et al.*, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para fins de aplicação a quantificação de níveis de poliaminas em uma cultura de células tumorais e investigar a formação de adutos com naftoquinonas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar reação de derivatização das poliaminas;
- ✓ Desenvolver método cromatográfico em fase reversa com detecção por fluorescência que permita a aplicação para quantificação de poliaminas em cultura de células tumorais;
- ✓ Validar o método de quantificação desenvolvido com base nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção e quantificação;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido para análise de poliaminas incubadas com naftoquinonas;
- ✓ Aplicar o método cromatográfico desenvolvido à análise de poliaminas em cultura de células tumorais tratadas com naftoquinonas

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras de poliaminas, naftoquinonas e cultura celular

As amostras do presente trabalho espermidina (S0266 - Sigma Aldrich[®]) e espermina (S4264 - Sigma Aldrich[®]), e as naftoquinonas lapachol e β -lapachona foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Celso de Amorim Camara da Universidade Federal Rural do Pernambuco. As mesmas foram acondicionadas em tubos de polipropileno cônicos (*eppendorffs*) de 1 mL, diluídas em água, nas concentrações de 56,8 mg/mL (espermidina) e 60,2 mg/mL (espermina) e armazenadas a uma temperatura de 4 °C. A cultura de células tumorais HL-60 foi fornecida pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Materiais e Equipamentos

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu configurado com os seguintes módulos: forno CTO – 10 AS, bomba LC – 10 AD com válvula solenoide, degasificador – DGU 14 A, módulo controlador – SCL 10 A, detector de fluorescência RF – 10 A. λ_{ex} = 365 nm; λ_{em} = 510 nm. A coluna cromatográfica utilizada foi uma da marca Phenomenex C18 de aço inox com 250 x 4,6 mm e a pré-coluna C18 da mesma marca. Usou-se ainda como instrumentos de trabalho, pipetas automáticas HTL[®], vials de vidro para CLAE e vidrarias de uso laboratorial.

4.3 Reagentes e Solventes

Como solventes foram utilizados: metanol grau HPLC, tolueno (Vetec[®]), acetona (Sigma Aldrich[®]). E como reagentes: hexanodiamina (Sigma Aldrich[®]), solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃), cloreto de dansila (Sigma Aldrich[®]) e L- Prolina (Sigma Aldrich[®]).

4.4 Preparo da amostra

4.4.1. Desenvolvimento da reação de derivatização e do método cromatográfico

O processo de reação de derivatização e o desenvolvimento do método cromatográfico tiveram como referência inicial o trabalho de Smith e Davies (1985), que descreveram um método cromatográfico de separação e quantificação de poliaminas em tecidos de plantas utilizando cloreto de dansila como reagente derivatizante. Partiu-se inicialmente da solução estoque das poliaminas espermidina (56,8 mg/mL) e espermina (60,2 mg/mL), as quais foram diluídas 100^2 vezes obtendo-se as concentrações 5,68 µg/mL de SPD e 6,02 µg/mL de SPM. Como experimento piloto considerou-se que a solução a ser derivatizada deveria conter 1 pmol/mL, retirou-se 255,6 µL da solução 5,68 µg/mL de SPD e 336 µL da solução 6,02 µg/mL de SPM a fim de obter as concentrações de SPD e SPM, 990 pmol/mL, das quais foram retirados 100 µL, que por sua vez foram adicionados em frascos de vidro para reação diferentes, cada um contendo 200 µL de solução saturada de carbonato de sódio e 400 µL de cloreto de dansila (DnsCl) em acetona (7,5 mg/mL). As misturas foram então incubadas em um bloco de reação térmica a 60 °C durante 1 hora. Em seguida adicionaram-se as misturas 100 µL de prolina para remover o excesso do cloreto de dansila. Depois de 30 minutos as poliaminas foram extraídas com 500 µL de tolueno, com vigorosa agitação no vortex por 30 segundos. As misturas ficaram separadas em duas fases, a inferior (aquosa) foi removida, a fase orgânica contendo as poliaminas foi completamente seca em nitrogênio, os resíduos de poliaminas foram dissolvidos em 1 mL de metanol, filtrados em membrana de nylon e imediatamente injetadas (injeção manual) separadamente no cromatógrafo com uma eluição em modo gradiente (60:95 v/v) das fases móveis metanol e água em 30 minutos, utilizando uma coluna C18 Thermoscientific[®] (150 x 4,6 mm), operando em um fluxo de 1 mL/min.

Para o experimento seguinte, resolveu-se fazer algumas modificações no procedimento de extração e nas soluções de poliaminas utilizadas. As soluções 5,68 µg/mL de SPD e 6,02 µg/mL de SPM ainda foram diluídas mais 4 vezes a fim de obter as concentrações 1,42 µg/mL (SPD) e 1,50 µg/mL (SPM), de onde foram

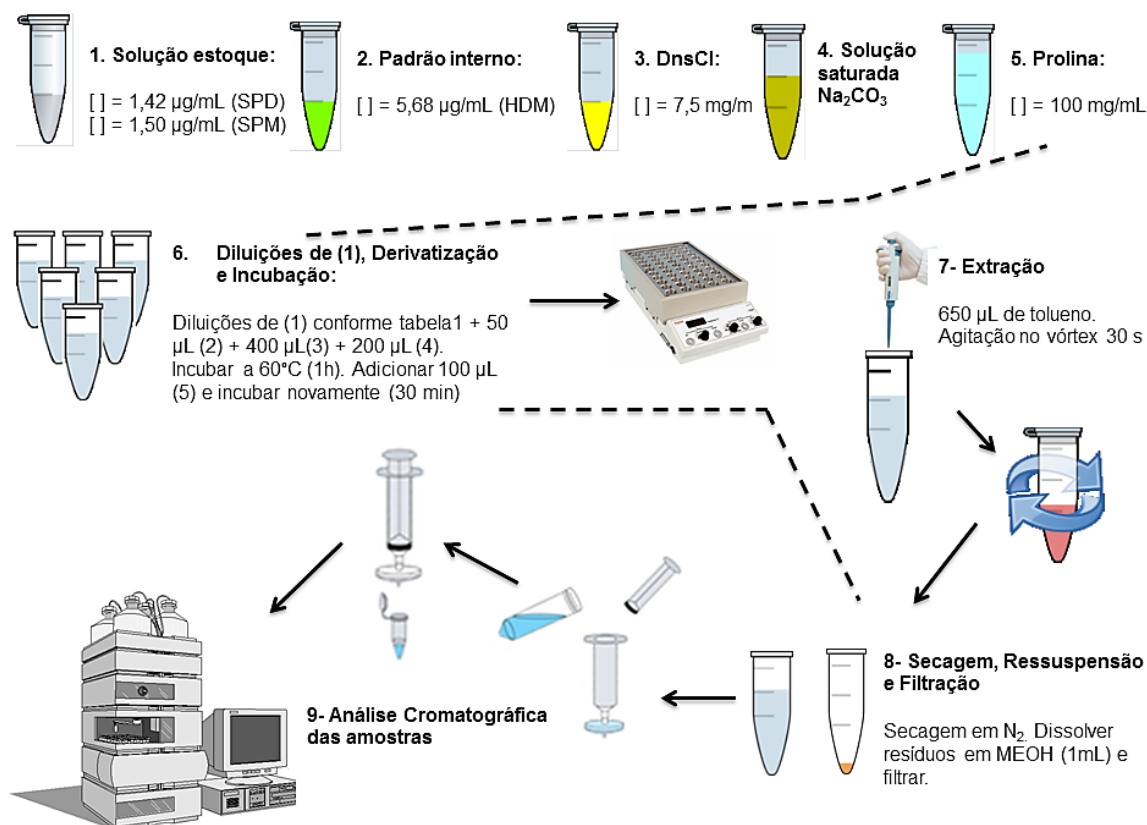
retirados diferentes volumes para serem derivatizados (tabela 1) e assim construir a curva de calibração.

Tabela 1 : Concentrações de espermidina e espermina utilizadas na reação de derivatização para obtenção da curva de calibração

Identificação	Volume (μL)	Concentração de SPD (pmol/mL)	Concentração de SPM (pmol/mL)
1	100	970	740
2	75	730	550
3	50	480	370
4	25	240	180
5	15	140	110
6	10	97	74

As alíquotas das diferentes concentrações de poliaminas: espermidina e espermina (tabela 1) foram adicionadas em um único frasco de vidro para reação contendo as mesmas quantidades de solução saturada de carbonato de sódio e de cloreto de dansila mencionadas anteriormente. A reação de derivatização procedeu-se nas mesmas condições anteriores com acréscimo do padrão interno hexanodiamina na concentração de 5,68 μg/mL.

A extração das poliaminas passou-se a ser realizada em duas etapas usando 650 μL de tolueno em cada um dos passos, com vigorosa agitação no vortex por 30 segundos. O restante da reação procedeu-se como descrito acima. Essa metodologia está ilustrada na Figura 7.

Figura 9: Fluxograma da reação de derivatização

As amostras das duas poliaminas nas concentrações citadas acima foram injetadas unidas numa mesma amostra, não mais separadamente como descrito anteriormente em modo de eluição gradiente (45:95 v/v) das fases móveis metanol e água (ME OH:H₂O) no tempo de análise de 50 minutos, utilizando uma coluna C18 Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna nas mesmas especificações. Tentou-se em seguida ajustar o gradiente e o tempo de corrida desse método. As condições finais do método cromatográfico desenvolvido após os ajustes encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Condições cromatográficas finais do método desenvolvido para detecção de poliaminas que poderá ser aplicado a quantificação em cultura de células tumorais

Sistema	Método Cromatográfico
Coluna	C18 Phenomenex® (250 x 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna nas mesmas especificações
Detector	Fluorescência (RF – 10 A)
Comprimento de onda	$\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Fase móvel	MEOH:H ₂ O (35:95)
Tipo de eluição	gradiente
Cromatógrafo líquido	Cromatógrafo da marca Shimadzu configurado com os seguintes módulos: forno CTO – 10 AS, bomba LC – 10 AD com válvula solenoide, degasificador – DGU 14 A, módulo controlador – SCL 10 A

4.5 Validação do método cromatográfico

4.5.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade repetiu-se a curva de calibração previamente construída, em três dias consecutivos, partindo das diluições estoques 1,42 $\mu\text{g/mL}$ e 1,50 $\mu\text{g/mL}$ de SPD e SPM respectivamente, obtendo-se a faixa de concentrações estabelecida na tabela 1 e injetou-se no cromatógrafo líquido nas condições estabelecidas na tabela 2.

Os coeficientes de correlação para cada curva foram calculados por meio da equação da reta, pelo método dos mínimos quadrados e avaliados dentro dos critérios mínimos de aceitação estabelecidos pela RE 899/2003.

4.5.2 Precisão

Após a construção da curva de calibração e constatada sua linearidade, a precisão foi verificada utilizando-se três concentrações baixa, média e alta, 3, 2 e 1

respectivamente, em oito réplicas para cada concentração. O ensaio foi repetido por 3 dias diferentes.

Com a obtenção da curva de calibração, efetuou-se a regressão linear no sentido de obter-se a equação da reta. Para calcular os valores reais das poliaminas SPD e SPM, substituiu-se o valor de y da equação pelos valores das áreas dos cromatogramas obtidos para as concentrações, baixa, média e alta. Com esses valores calculou-se a precisão através do coeficiente de variação aplicando a seguinte fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

4.5.3 Exatidão

Para constatar a exatidão utilizaram-se os mesmo dados e condições experimentais do ensaio de precisão. A curva de calibração e a regressão linear usadas na determinação da precisão também foram aplicadas para verificar a exatidão. A concentração média experimental foi calculada substituindo-se a incógnita y da equação da reta pela média das áreas do padrão interno (hexanodiamina)/SDP ou SPM obtidas para as concentrações baixa, média e alta, da seguinte forma:

$$y = ax + b \quad \longrightarrow \quad x = \frac{(y-b)}{a}$$

Onde, x é a concentração média experimental, y a média das áreas do padrão interno (hexanodiamina)/SDP ou SPM, b o coeficiente linear e a o coeficiente angular. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média experimental (CME) pela concentração teórica (CT) e multiplicando por 100:

$$E = \frac{CME}{CT} \times 100$$

4.5.4 Seletividade

A seletividade foi determinada diluindo-se as concentrações 1,42 $\mu\text{g/mL}$ (SPD) e 1,50 $\mu\text{g/mL}$ (SPM), obtendo-se as concentrações finais 0,48 e 0,37 pmol/mL respectivamente. Estas soluções foram submetidas à reação de derivatização descrita no tópico 4.4.1, acrescidas de 250 μL de meio de cultura RMPI-1640 (R8758 - Sigma Aldrich[®]) completo, ou seja, contendo proteínas.

4.5.5 Limite de Detecção e Quantificação

A análise do limite de detecção foi realizada como base na relação sinal/ruído (S/N) obtida de uma média da menor concentração de três curvas de calibração, considerando como limite de detecção a concentração que produziria relação sinal-ruído superior a 3:1. O limite de quantificação também foi estabelecido pela relação sinal/ruído e considerou-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

4.6 Aplicação do método cromatográfico para análise de poliaminas incubadas com naftoquinonas

Em princípio preparou-se uma solução estoque de lapachol a 4,85 mg/mL, que foi em seguida diluída para obter a concentração 4,85 µg/mL, da qual foram retirados 50 µL e adicionados a um frasco de vidro para reação contendo 50 µL do padrão interno: hexanodiamina e o mesmo volume de SPD 1,42 µg/mL e de SPM 1,50 µg/mL, deixou-se reagir essa mistura durante 17 horas a temperatura ambiente. Logo após foram adicionados 200 µL de solução saturada de Na₂CO₃ e 400 µL de cloreto de dansila e procedeu-se com a reação de derivatização normalmente. As amostras foram preparadas em sextuplicata e posteriormente injetadas no método cromatográfico desenvolvido nas condições estabelecidas na tabela 2.

4.7 Aplicação do método cromatográfico desenvolvido à análise de poliaminas em cultura de células tumorais tratadas com β-lapachona

As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos: penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL e suplementado com 10% de SBF e foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e em seguida incubadas com 5% de CO₂ a 37°C. O crescimento celular foi acompanhado durante 48 horas. Após esse período as células foram centrifugadas a 500 g durante 5min e resuspensas em 5mL de meio RPMI para contagem em câmara de Newbayer. A

cultura apresentou acima de 90% de células viáveis eram então destinadas ao experimento.

Inicialmente retirou-se uma alíquota de 1150 mL da suspensão celular tumoral (HL-60 em meio RPMI) e acrescentou-se 5850 mL do meio RPMI para realizar o plaqueamento. Em seguida retirou-se 1 mL da suspensão e transferiu-se para placas. Logo após, foi retirado 20 µL da solução de β-lapachona 20 mM em DMSO e adicionou-se 180 µL do meio RPMI para obter a solução 2mM da qual foram retirados os volumes: 1,2 µL, 6 µL e 3 µL aos quais foram acrescentados 1188 µL, 1194 µL e 1197 µL do meio RPMI respectivamente a fim de obter as soluções: 20 µM, 10 µM e 5 µM que foram então acrescentadas nas placas contendo a suspensão celular HL-60 e incubou-se 24 horas.

Após o período de incubação retirou-se o conteúdo das placas e transferiu-se para eppendorffs de 2mL e centrifugou-se durante 4 minutos a 25°C a 200 rpm e o sobrenadante desprezado. Em seguida realizou-se uma lavagem com 500 µL de tampão fosfato de sódio (PBS), centrifugou-se e desprezou-se o sobrenadante. Logo após foi adicionado ao pellet formado 300 µL de um tampão de lise que é um composto constituído por uma mistura de detergentes, incluindo o dodecil sulfato de sódio (SDS) e deixou-se reagir durante 30 minutos no gelo, homogeneizando a cada 5 minutos. Na sequência submeteu-se a suspensão a uma centrifugação durante 15 minutos a 6 °C a 10400 g e retirou-se o sobrenadante.

Para determinação das poliaminas, transferiu-se uma alíquota de 80 µL do sobrenadante para um eppendorff e adicionou-se 50 µL do padrão interno hexanodiamina e 30 µL de ácido perclórico (0,25 M). A mistura foi então centrifugada a 13000 g, 4°C durante 10 minutos e em seguida acrescentou-se 60 µL de tampão borato (0,2 M, pH = 9,3), de acordo com o trabalho desenvolvido por Weiss e colaboradores (2004). A derivatização e a extração seguiram-se conforme relatado anteriormente. As amostras foram então injetadas em triplicata, nas mesmas condições estabelecidas na tabela 2, sendo necessário apenas uma singela modificação no gradiente e na composição da fase móvel, a qual foi acrescentada acetonitrila (ACN), fornecendo a seguinte condição final da fase móvel e gradiente de injeção das amostras: MEOH:ACN:H₂O (35:92).

4.7.1 Análise estatística

As amostras foram analisadas em triplicata com um $n \geq 3$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,0001$.

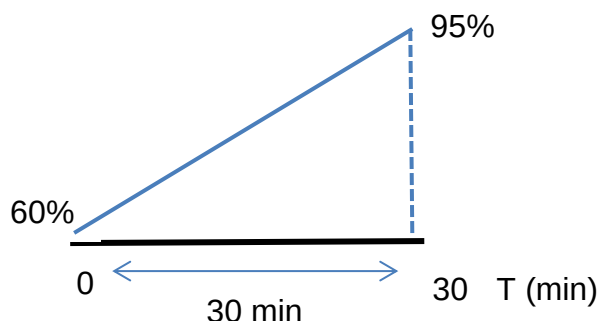
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da reação de derivatização com cloreto de dansila e do método cromatográfico

O desenvolvimento de métodos cromatográficos é baseado em várias considerações como, por exemplo, no conhecimento da natureza da amostra a ser analisada e das condições experimentais de separação (SNYDER, KIRKLAND; DOLAN, 2011). Conforme já descrito anteriormente o método mais sensível para detecção de poliaminas é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência.

O primeiro experimento realizado foi obtido com a injeção de SPD e SPM, 990 pmol/mL separadamente e submetidas anteriormente à reação de derivatização conforme descrita no item 4.4.1; no método gradiente 60-95% das fases móveis MEOH e H₂O, no tempo de corrida de 30 minutos (figura 8).

Figura 10: Método gradiente metanol:água (60:95%) em 30 min



Este resultou nos cromatogramas representados nas figuras 11 e 12, nos quais se pode observar que ambos apresentavam dois picos nos mesmos tempos de retenção em 2,5 e 7,5 minutos, não sendo assim possível afirmar se os picos pertenciam as poliaminas analisadas. Provavelmente a não identificação correta dos picos pode ter sido devido à extração ineficiente, ou que o método de separação não era adequado, ou ainda que a dimensão da coluna utilizada não estivesse sendo suficiente para ocorrer a separação de todas as amostras.

Figura 11: Cromatograma representativo da injeção do derivado fluorescente de SPD 990 pmol/mL eluído em modo gradiente com MEOH:H₂O (60:95%) em 30 minutos.

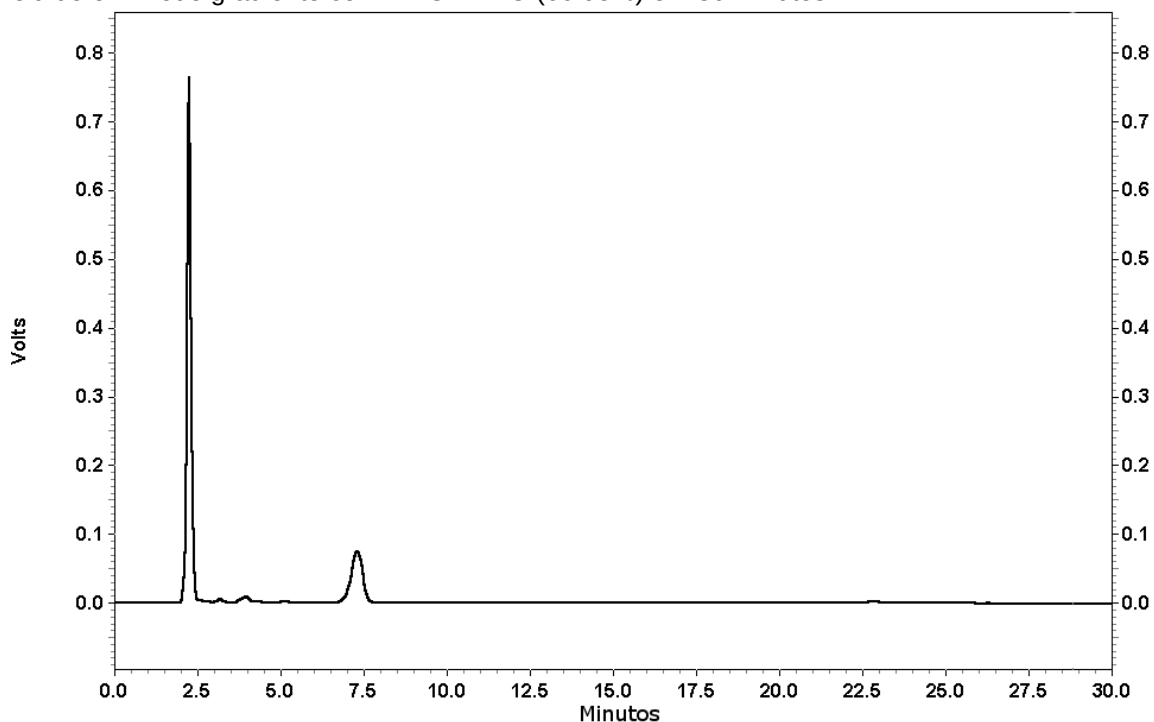
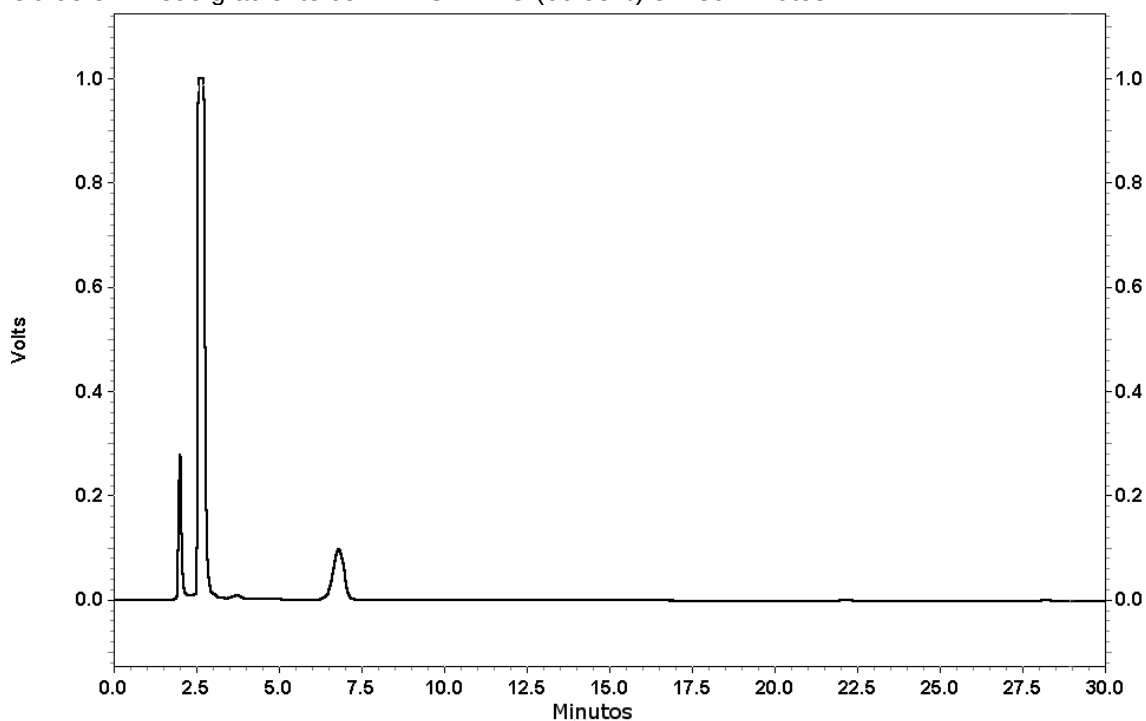


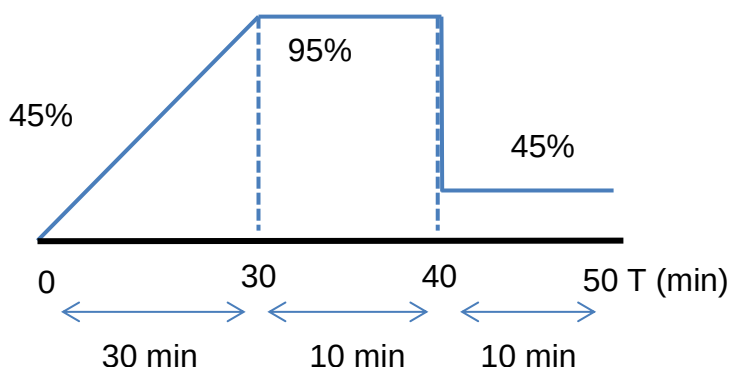
Figura 12: Cromatograma representativo da injeção do derivado fluorescente de SPM 990 pmol/mL eluído em modo gradiente com MEOH:H₂O (60:95%) em 30 minutos.



Logo, buscou-se modificar a proporção da fase móvel para o gradiente representado na figura 13 e aumentar o volume de tolueno usado na extração, bem como realizar essa etapa mais de uma vez, e ainda trocar a coluna, por outra de

dimensões maiores. Além disso, como o método em desenvolvimento teria a finalidade de aplicação em amostras biológicas, procurou-se também no próximo experimento reunir as poliaminas no mesmo frasco de vidro para reação a ser derivatizado e posteriormente injetado e adicionar ainda um padrão interno.

Figura 13: Método gradiente metanol:água (45:95%) em 50 min



Desse modo, a figura 14 representa o cromatograma obtido com a injeção das amostras 970 pmol/mL e 740 pmol/mL de SPD e SPM unidas, ou seja, contidas no mesmo vial de reação de derivatização, e extraídas com 650 μ L de tolueno e acrescidas do padrão interno; no método gradiente MEOH:H₂O (45:95%) com tempo de análise de 50 minutos; e o mesmo foi aplicado para as amostras 240 pmol/mL e 180 pmol/mL representado na figura 15. Os picos de interesse eluíram entre 34 e 40 minutos, sendo o primeiro atribuído ao padrão interno hexanodiamina, os picos em 36 e 40 minutos, respectivamente foram atribuídos a SPD e SPM. Esses picos foram assim atribuídos uma vez que foram realizadas injeções de cada pico de interesse isoladamente e comparados também com métodos semelhantes na literatura (SMITH e DAVIES, 1985; FU *et al.*, 1998; MARCÉ *et al.*, 1995).

Figura 14: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 970 pmol/mL e 740 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H₂O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse ampliada (B).

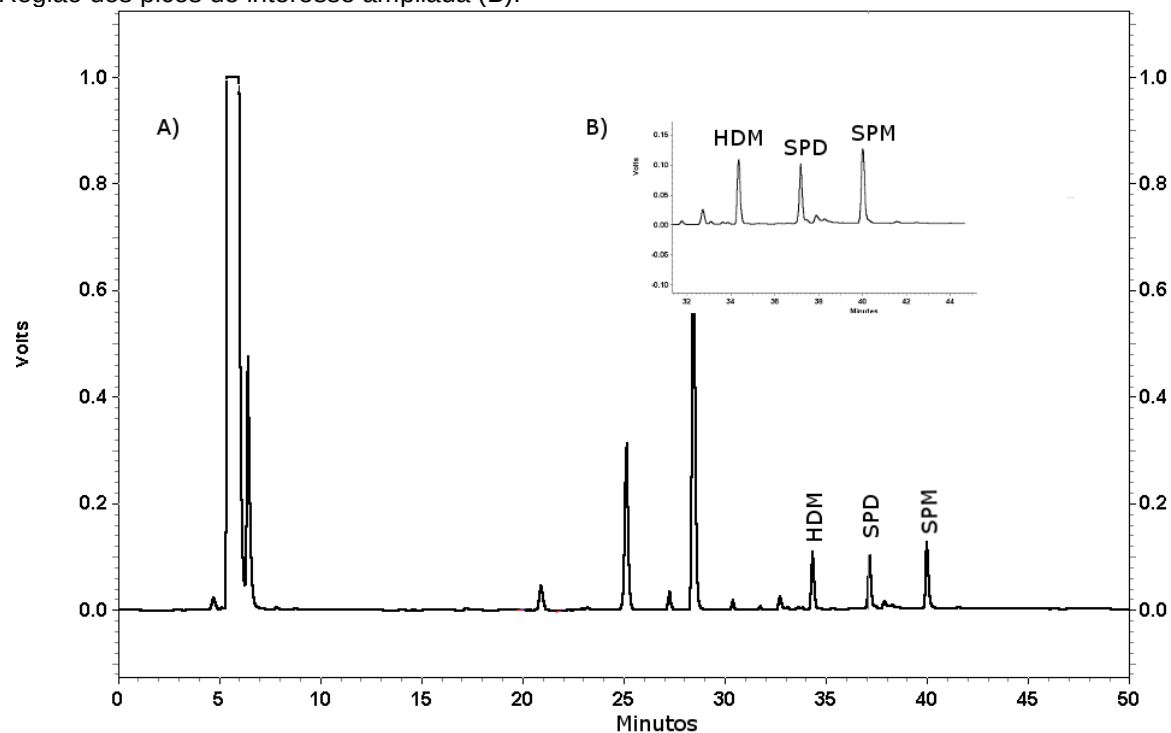
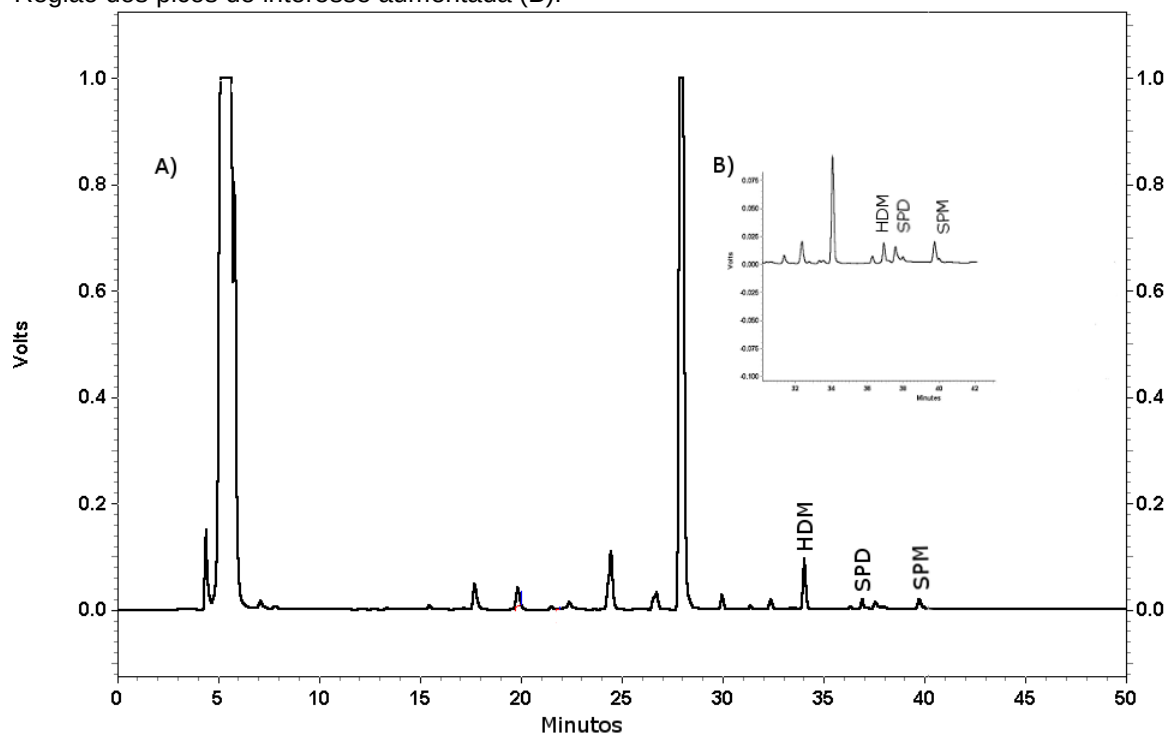
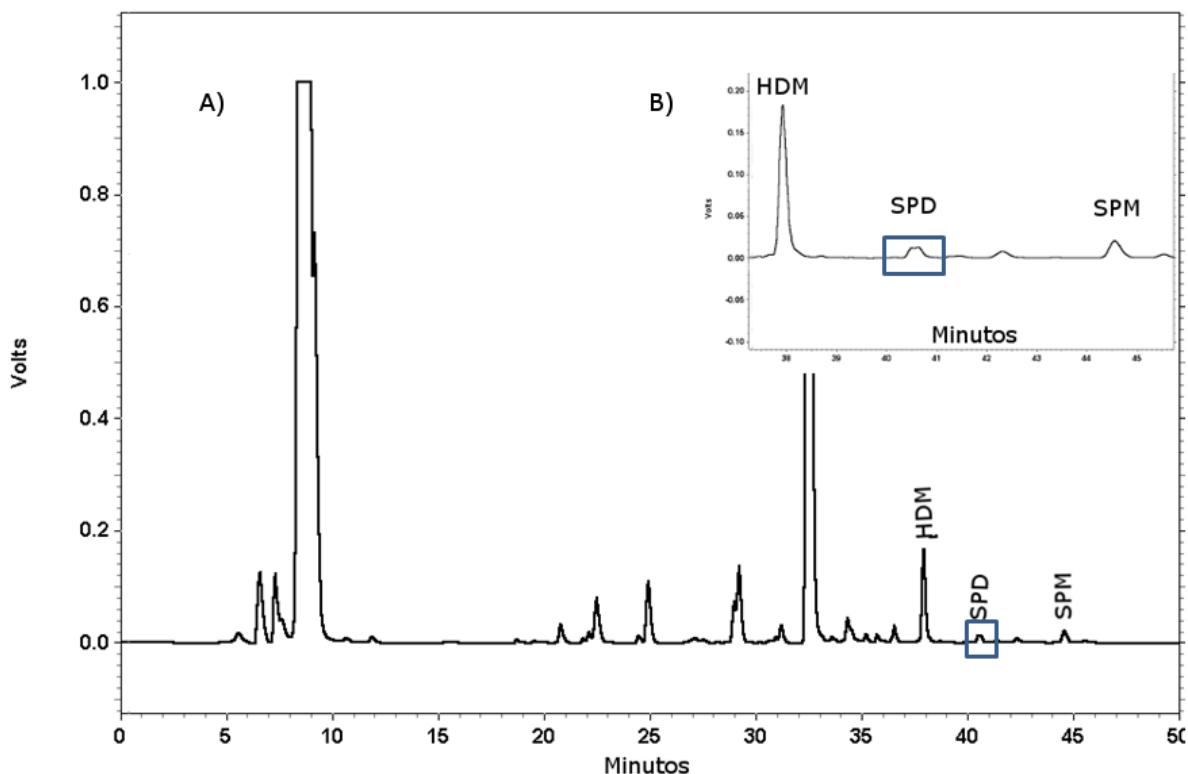


Figura 15: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 240 pmol/mL e 180 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H₂O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).



Esse método parecia ser eficiente, entretanto foi observado em análises posteriores que os picos de interesse estavam coeluído com outros menores, sem importância para esse estudo, provavelmente de produtos de degradação oriundos da reação da derivatização, como pode ser visualizado na região em destaque da figura 16 B.

Figura 16: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 97 pmol/mL e 74 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H₂O (45:95%) em 50 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).



Para resolver esse problema buscou-se tentar diminuir o tempo de corrida que ainda estava muito longo, e provavelmente poderia estar ocasionando a perda de resolução entre os picos, modificando o gradiente do método e diminuindo a porcentagem inicial do solvente orgânico (metanol), tentou-se ainda aumentar para 10 minutos o tempo de espera entre uma injeção e outra, que antes era de 5 minutos e parecia ser insuficiente para que o sistema se reestabelecesse, o que também estaria ocasionando uma eluição mais rápida de alguns picos e consequentemente uma coeluição. O novo gradiente utilizado está mostrado na figura 17 e resultou nos cromatogramas representados nas figuras 18 e 19.

Figura 17: Método gradiente metanol:água (35:95%) em 35 min

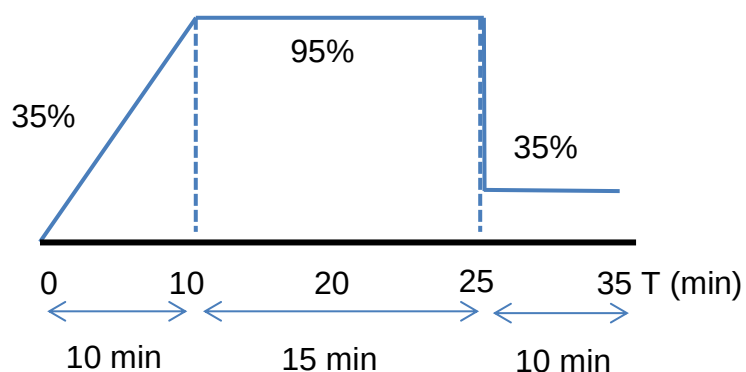


Figura 18: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 970 pmol/mL e 740 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H₂O (35:95%) em 35 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).

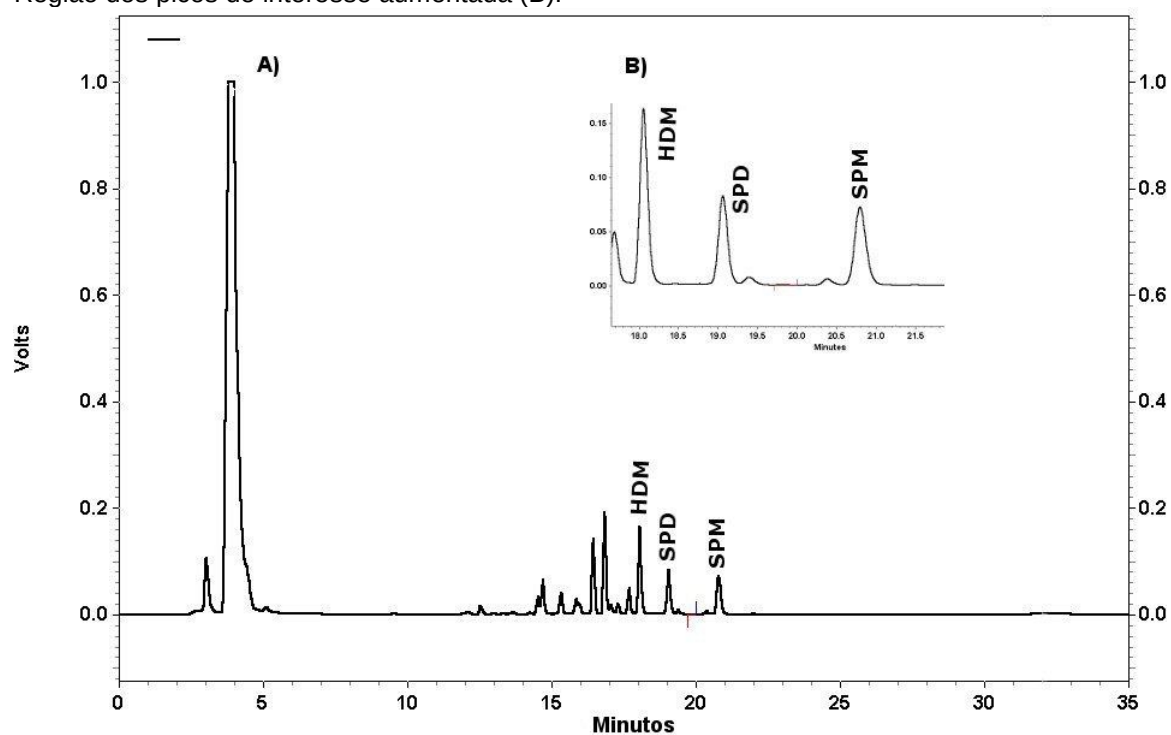
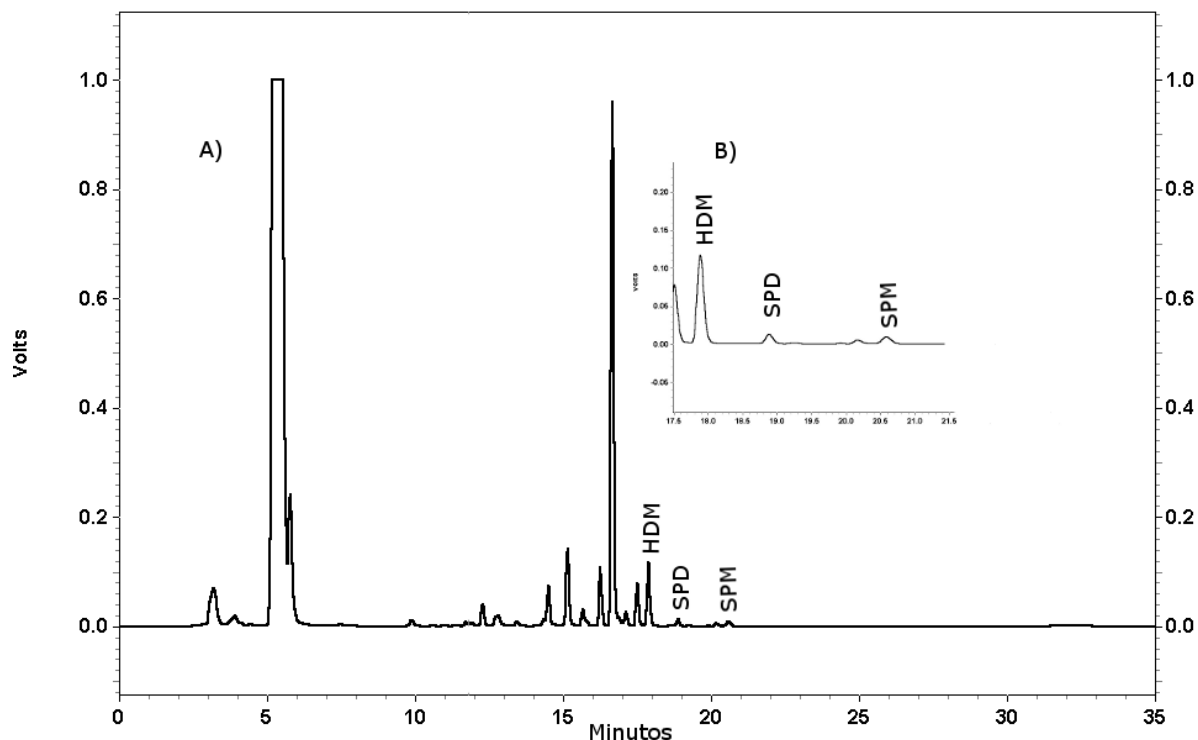


Figura 19: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 240 pmol/mL e 180 pmol/mL eluídos em modo gradiente com MEOH:H₂O (35:95%) em 35 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B).



Como esperado houve uma redução no tempo de análise consequentemente no tempo de retenção dos analitos. Os picos de interesse eluíram em 18, 19 e 21 minutos, sendo o primeiro atribuído a hexanodiamina e os dois últimos a SPD e SPM, respectivamente e com uma boa resolução entre eles. Encontrada as condições adequadas da reação de derivatização, de extração e separação, passou-se então a validação do método cromatográfico.

5.2 Validação do método cromatográfico para quantificação de poliaminas em cultura de células tumorais

5.2.1 Linearidade

As tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e; os gráficos 1, 2 e 3 mostram os resultados obtidos para a determinação da linearidade das poliaminas SPD e SPM, onde as áreas são expressas pela razão entre a área das poliaminas pela área da hexanodiamina, que por regressão linear obtiveram um r^2 variando entre 0,9904 e 0,9923 para SPD, já para SPM o r^2 variou entre 0,9927 e 0,9943, nos três dias de

análise, todos superiores a 0,98 conforme preconiza a RE 899 (BRASIL, 2003). O método é considerado linear para as faixas de concentrações analisadas.

Tabela 3: Áreas dos picos cromatográficos da primeira curva de calibração para SPD

SPD (pmol/mL)	Áreas		Média
970	0,5738	0,5601	0,5669
730	0,4592	0,4602	0,4597
480	0,3298	0,3170	0,3234
240	0,1423	0,1374	0,1398
140	0,1223	0,1233	0,1228
97	0,0703	0,0682	0,0692

Tabela 4: Áreas dos picos cromatográficos da primeira curva de calibração para SPM

SPM (pmol/mL)	Áreas		Média
740	0,6326	0,6425	0,6375
550	0,4496	0,4633	0,4565
370	0,3677	0,3548	0,3612
180	0,1555	0,1520	0,1538
110	0,1024	0,1047	0,1036
74	0,0705	0,0714	0,0710

Gráfico 1: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 1º dia no intervalo das concentrações estabelecidas

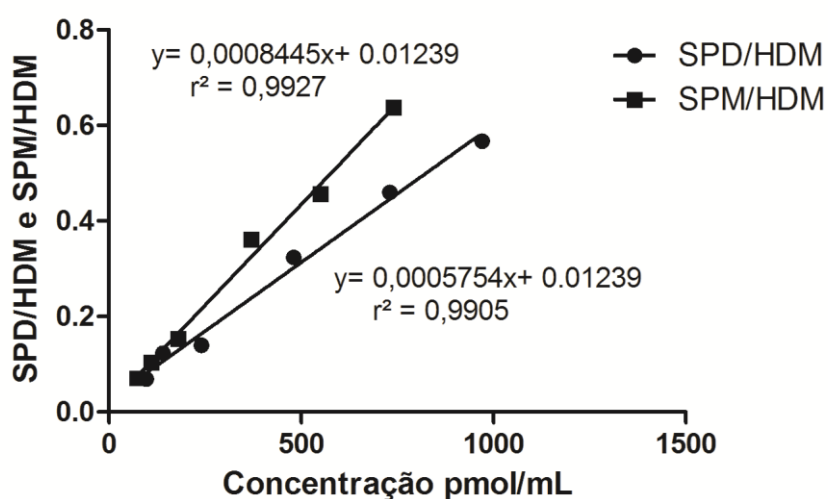


Tabela 5: Áreas dos picos cromatográficos da segunda curva de calibração para SPD

SPD (pmol/mL)	Áreas		Média
970	0,5538	0,5536	0,5537
730	0,4678	0,4596	0,4637
480	0,2772	0,2764	0,2768
240	0,1658	0,1595	0,1627
140	0,1030	0,1233	0,1131
97	0,0795	0,0787	0,0791

Tabela 6: Áreas dos picos cromatográficos da segunda curva de calibração para SPM

SPM (pmol/mL)	Áreas		Média
740	0,7066	0,7075	0,7071
550	0,5309	0,5517	0,5413
370	0,3338	0,3137	0,3237
180	0,2020	0,1880	0,1950
110	0,0997	0,0860	0,0929
74	0,0847	0,0845	0,0846

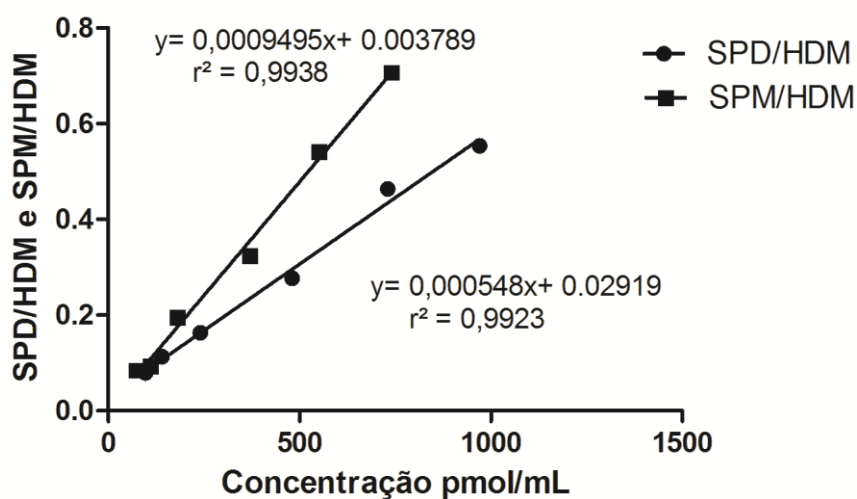
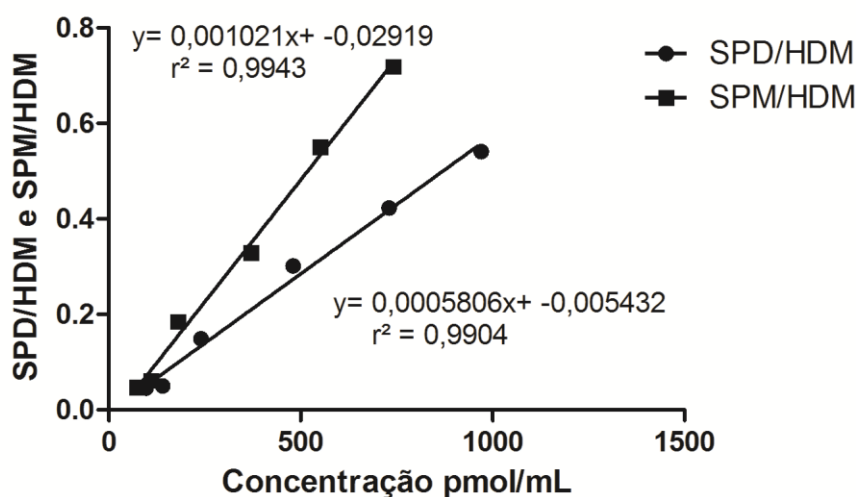
Gráfico 2: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 2º dia no intervalo das concentrações estabelecidas

Tabela 7: Áreas dos picos cromatográficos da terceira curva de calibração para SPD

SPD (pmol/mL)	Áreas		Média
970	0,5448	0,5366	0,5407
730	0,4215	0,4250	0,4232
480	0,2999	0,3032	0,3016
240	0,1481	0,1492	0,1487
140	0,0546	0,0459	0,0503
97	0,0417	0,0495	0,0456

Tabela 8: Áreas dos picos cromatográficos da terceira curva de calibração para SPM

SPM (pmol/mL)	Áreas		Média
740	0,7201	0,7174	0,7187
550	0,5519	0,5481	0,5500
370	0,3282	0,3316	0,3299
180	0,1847	0,1856	0,1852
110	0,0637	0,0591	0,0614
74	0,0476	0,0457	0,0467

Gráfico 3: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade obtida para o 3º dia no intervalo das concentrações estabelecidas

As Tabelas 9 e 10 mostram a média geral dos picos cromatográficos das três curvas de calibração referente aos três dias de análise da linearidade para SPD e SPM. Dessa forma, construiu-se o gráfico da curva de calibração (gráfico 4) e fez-se a regressão linear obtendo-se a equação da reta, sendo o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9966$ para SPD e $r^2 = 0,9987$ para SPM.

Tabela 9: Média das três curvas de calibração obtidas para SPD no estudo da linearidade

SPD (pmol/mL)	Média 1	Média 2	Média 3	Média Geral
970	0,5407	0,5537	0,5669	0,5538
730	0,4232	0,4637	0,4597	0,4489
480	0,3016	0,2768	0,3234	0,3006
240	0,1487	0,1627	0,1398	0,1504
140	0,0503	0,1131	0,1228	0,0954
97	0,0456	0,0791	0,0692	0,0646

Tabela 10: Média das três curvas de calibração obtidas para SPM no estudo da linearidade

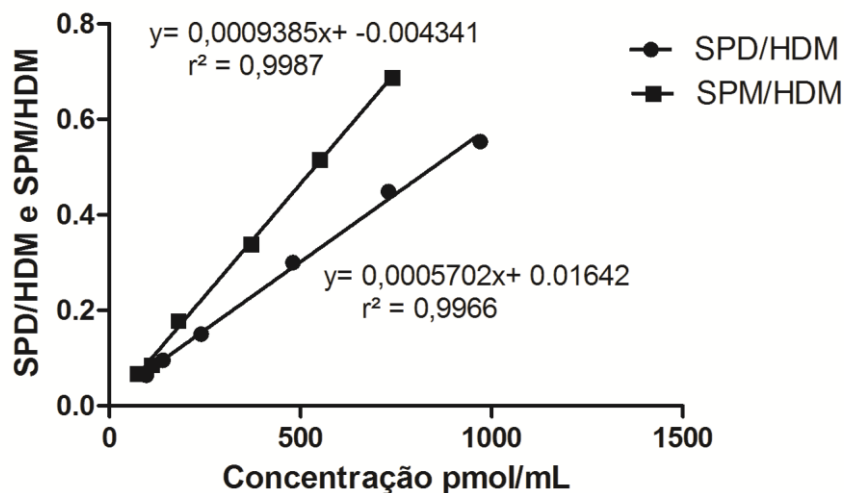
SPM (pmol/mL)	Média 1	Média 2	Média 3	Média Geral
740	0,6375	0,7071	0,7187	0,6878
550	0,4565	0,5413	0,5500	0,5159
370	0,3299	0,3237	0,3612	0,3383
180	0,1852	0,1950	0,1538	0,1780
110	0,0614	0,0929	0,1036	0,08595
74	0,0467	0,0846	0,0710	0,06743

No método desenvolvido por Venza e colaboradores (2001), o gradiente de eluição foi realizado com as fases móveis metanol e água e a derivatização pré-coluna com o-ftalaldeído a fim de determinar poliaminas em saliva humana. Nesse método, o coeficiente de correlação obtido foi idêntico ao conseguido neste trabalho.

Escribano e Legaz (1988) descreveram uma metodologia semelhante à usada neste estudo para detectar poliaminas em algas. Com uma variação na porcentagem da fase móvel metanol:água de 50 a 80% durante 30 minutos e uma coluna Micro-Pak MCH-5N cap (Varian) (15 cm x 4 mm) eles obtiveram um coeficiente de correlação de 0,97 para espermidina e 0,99 para espermina. Já Hiramatsu e colaboradores (1994) desenvolveram um método para detecção de poliaminas livres e acetiladas em urina, usando uma coluna C¹⁸ polimérica, um componente adicional de reator de enzima e um detector eletroquímico; eles encontraram um coeficiente de correlação de 0,98.

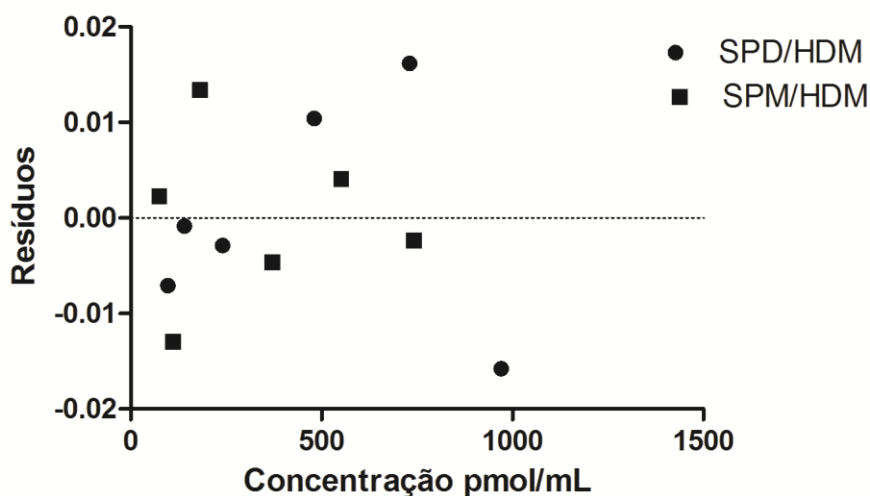
As diferenças de linearidade entre o procedimento utilizado neste estudo e outros métodos de CLAE podem estar relacionadas ao gradiente da fase móvel, a coluna, detector ou faixa de concentração utilizados.

Gráfico 4: Gráfico das três médias das curvas de calibração da espermidina e espermina para determinação da linearidade



O Gráfico 5 mostra que não houve uma tendência de distribuição não aleatória dos resíduos, confirmando a validade do modelo de calibração adotado.

Gráfico 5: Gráfico de resíduos dos dados de linearidade



5.2.2 Exatidão e Precisão

As tabelas e gráficos abaixo representam a precisão/exatidão determinadas através do parâmetro repetibilidade (intra-dia), avaliada pelo coeficiente de variação percentual obtido na determinação da razão entre as áreas dos picos cromatográficos das poliaminas espermidina/espermina pela hexanodiamina (HDM) nas concentrações baixa (B), média (M) e alta (A) para SPD 480, 730 e 970 pmol/mL respectivamente; e para SPM 370, 550 e 740 pmol/mL respectivamente obtidos em três dias consecutivos (inter-dias).

Tabela 11: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPD no 1º dia

SPD (pmol/mL)	480	730	970
	0,35	0,49	0,58
	0,35	0,50	0,57
	0,41	0,51	0,64
Áreas de SPD e SPM / HDM	0,33	0,49	0,71
	0,34	0,49	0,67
	0,35	0,57	0,67
	0,32	0,58	0,65
Médias das áreas	0,35	0,52	0,64
Médias das concentrações	0,56	0,86	1,09
DP	0,03	0,04	0,05
Precisão (%)*	8,81	7,58	7,97
Exatidão (%)**	110,16	112,14	106,73

Limites aceitáveis: * $\leq 15\%$ para as concentrações M e A; $\leq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

Tabela 12: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 1º dia

SPM (pmol/mL)	370	550	740
	0,39	0,55	0,61
	0,37	0,59	0,60
	0,46	0,51	0,74
Áreas SPM/HDM	0,32	0,47	0,88
	0,34	0,51	0,76
	0,38	0,63	0,83
	0,32	0,69	0,77
Médias das áreas	0,37	0,57	0,74
Médias das concentrações	0,42	0,66	0,86
DP	0,05	0,08	0,11
Precisão (%)*	13,25	13,49	14,40
Exatidão (%)**	114,14	119,17	116,33

Limites aceitáveis: * $\leq 15\%$ para as concentrações M e A; $\leq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

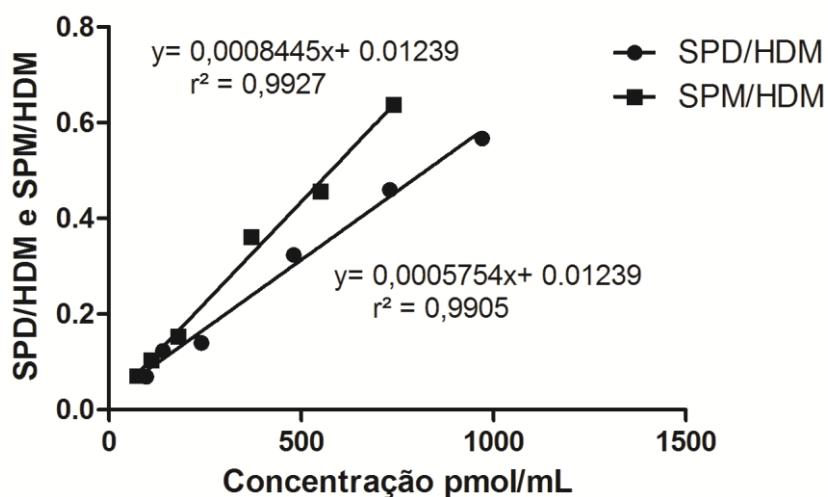
Gráfico 6: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 1º dia

Tabela 13: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPD no 2º dia

SPD (pmol/mL)	480	730	970
	0,27	0,52	0,47
	0,35	0,51	0,58
	0,28	0,43	0,50
Áreas de SPD/HDM	0,31	0,37	0,62
	0,29	0,41	0,62
	0,31	0,47	0,53
	0,26	0,41	0,56
Médias das áreas	0,29	0,44	0,55
Médias das concentrações	0,47	0,75	0,96
DP	0,03	0,06	0,06
Precisão (%)*	9,50	12,60	10,68
Exatidão (%)**	100,97	103,50	98,82

Limites aceitáveis: * $\geq 15\%$ para as concentrações M e A; $\geq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

Tabela 14: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 2º dia

SPM (pmol/mL)	370	550	740
	0,30	0,59	0,60
	0,40	0,54	0,69
	0,34	0,51	0,56
Áreas de SPM/HDM	0,41	0,49	0,83
	0,34	0,46	0,67
	0,40	0,58	0,62
	0,31	0,59	0,71
Médias das áreas	0,36	0,54	0,67
Médias das concentrações	0,37	0,56	0,70
DP	0,04	0,05	0,09
Precisão (%)*	12,63	9,96	13,00
Exatidão (%)**	100,24	102,21	94,57

Limites aceitáveis: * $\leq 15\%$ para as concentrações M e A; $\leq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

Gráfico 7: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 2º dia

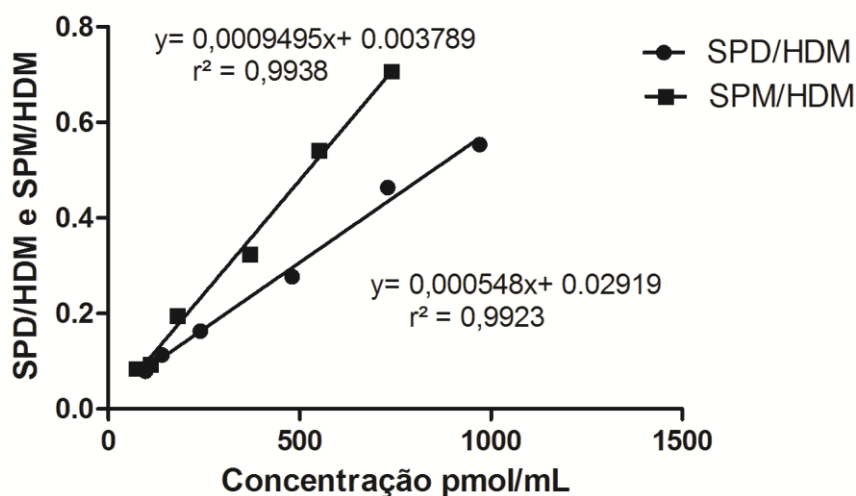


Tabela 15: Valores de exatidão e precisão obtidas para as concentrações B, M e A de SPD no 3º dia

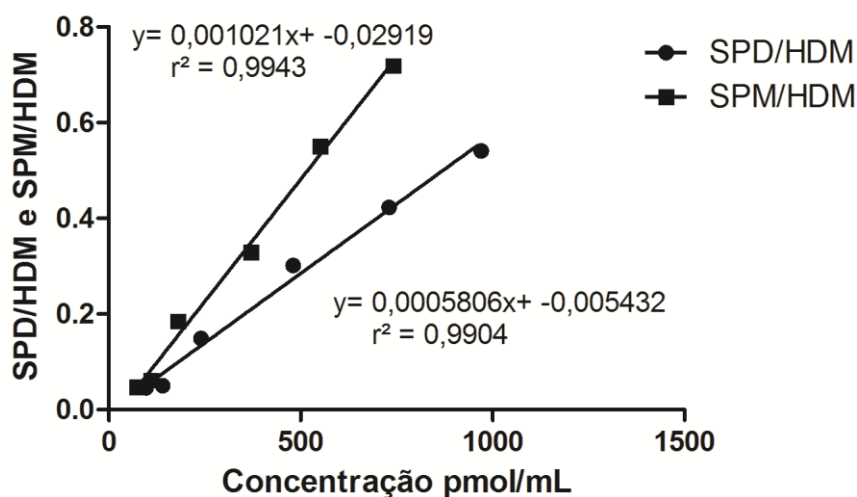
SPD (pmol/mL)	480	730	970
	0,32	0,47	0,51
	0,27	0,43	0,47
	0,32	0,49	0,53
Áreas de SPD/HDM	0,25	0,49	0,45
	0,32	0,38	0,55
	0,33	0,43	0,52
	0,27	0,41	0,54
Médias das áreas	0,30	0,44	0,51
Médias das concentrações	0,51	0,78	0,90
DP	0,03	0,04	0,04
Precisão (%)*	10,84	9,47	7,42
Exatidão (%)**	109,00	105,75	91,71

Limites aceitáveis: * $\geq 15\%$ para as concentrações M e A; $\geq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

Tabela 16: Valores de exatidão e precisão obtidas para a concentrações B, M e A de SPM no 3º dia

SPM (pmol/mL)	370	550	740
	0,41	0,57	0,60
	0,33	0,58	0,74
	0,37	0,64	0,76
Áreas de SPM/HDM	0,34	0,68	0,52
	0,42	0,51	0,74
	0,43	0,63	0,66
	0,38	0,53	0,70
Médias das áreas	0,38	0,59	0,67
Médias das concentrações	0,40	0,60	0,69
DP	0,04	0,06	0,09
Precisão (%)*	10,17	10,42	13,03
Exatidão (%)**	109,29	109,96	92,88

Limites aceitáveis: * $\geq 15\%$ para as concentrações M e A; $\geq 20\%$ para a concentração B (RE 899/2003)
 ** 80 a 120% (RE 899/2003)

Gráfico 8: Curva de calibração da espermidina e espermina para determinação da precisão e exatidão obtida para o 3º dia

O método proposto exibiu excelente precisão e exatidão. Um estudo para determinação de poliaminas em urina, utilizando cloreto de dansila como reagente de derivatização e extração em fase sólida, realizado por Mollin-Legua e colaboradores (1999) apresentou uma recuperação inferior, de 80% para espermidina e de 82% para espermina e precisão semelhante à obtida neste trabalho. Schenkel e colaboradores (1995) também relataram em seu estudo valores

de precisão aceitáveis e seus resultados ainda indicam que a hexanodiamina funciona como um bom padrão interno, com uma boa precisão. Enquanto Cann-Moisan; Caroff; Girin (1992) descreveram que o uso da hexanodiamina, como um padrão interno, é inadequado para a quantificação de espermidina e espermina em células vermelhas do sangue, uma vez que apresentaram recuperação percentual de 70%.

A determinação de poliaminas em leite, na faixa de concentração 0,5 a 5,0 nmol/mL, utilizando cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) como reagente derivatizante; forneceu valores menores de coeficiente de variação (3,0 a 8,6%) (Bellagamba *et al.* 1997).

5.2.3 Seletividade

O objetivo da seletividade foi verificar se o método era eficiente o suficiente na separação das poliaminas de outras proteínas presentes no meio de cultura celular. A figura 18 mostra o cromatograma obtido com a injeção de SPD e SPM 480 e 370 pmol/mL respectivamente, acrescidas de 250 μ L de meio de cultura RMPI completo. Foi observado que as proteínas contidas no meio de cultura não interferiram com os picos cromatográficos das poliaminas, demonstrando a eficiência de separação do método proposto, o que dá garantia que o mesmo é seletivo para a quantificação de poliaminas em cultura de células tumorais.

O presente método oferece a determinação seletiva de poliaminas, sem picos interferentes com os picos das mesmas, sem a necessidade de etapas adicionais na preparação da amostra, de acordo com o método cromatográfico desenvolvido por Yoshida e colaboradores (2004) para determinar poliaminas em urina humana.

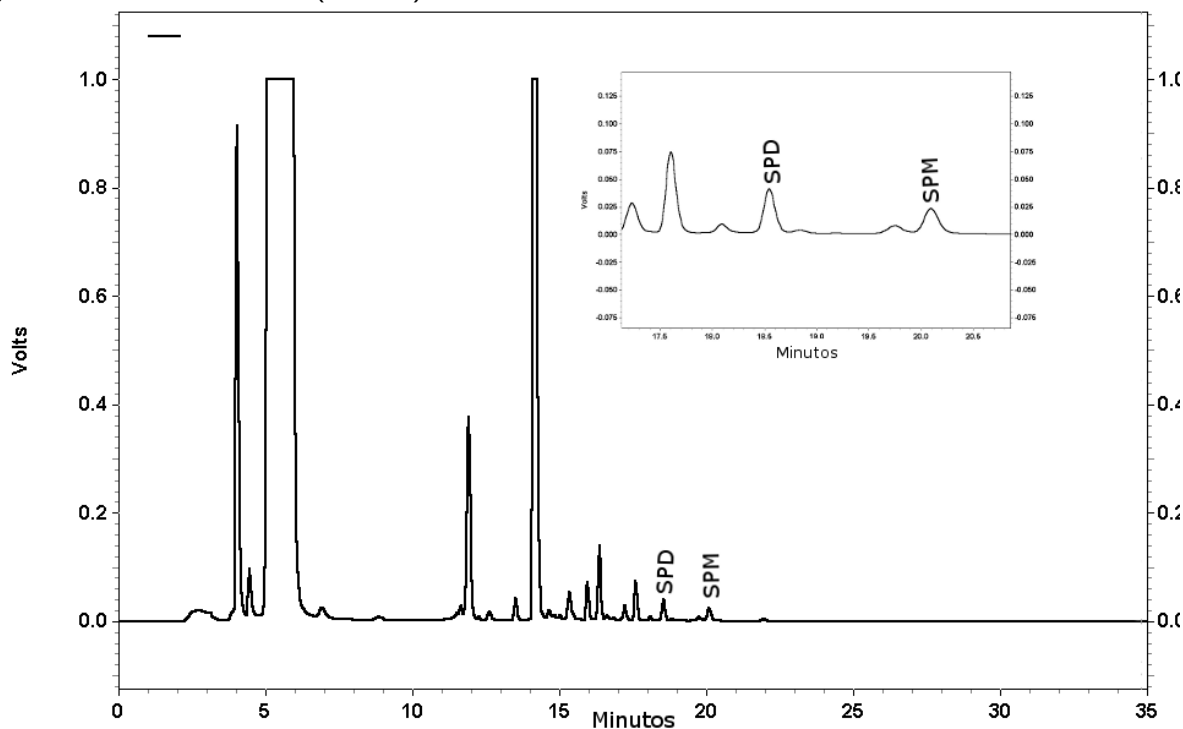
Um método para a determinação de poliaminas no soro por eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção indireta por ultravioleta foi estabelecido por Zhou e colaboradores (1995). Os cromatogramas conseguidos por esses autores não mostrou uma boa separação entre os picos das poliaminas.

Em 2013 Iijima e colaboradores investigaram a eficácia e utilidade de um método de derivatização pós-coluna, utilizando OPA como reagente derivatizante para detectar aminas empregando cromatografia a líquido de ultra alta eficiência

(CLUAE). Nesse estudo eles obtiveram uma melhor separação dos picos da espermidina e espermina, em comparação com um método de CLAE convencional e ainda notaram que a intensidade do pico da espermina no CLUAE foi notavelmente mais alta do que aquela observada no cromatograma obtido com a técnica de CLAE usual.

As variações de seletividade observadas entre este estudo e outros métodos de CLAE podem estar relacionadas ao uso de diferentes matrizes, dimensão da coluna utilizada ou a sensibilidade da técnica.

Figura 20: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 480 pmol/mL e 370 pmol/mL, acrescidos de meio de cultura celular RMPI completo eluídos em modo gradiente com ME OH:H₂O (35:95%).



5.2.4 Limite de detecção e quantificação

Foi obtida uma média de 80 para a relação sinal/ruído a partir das relações S/N: 97, 82 e 61 da concentração 97 pmol/mL de SPD, então considerando-se a relação 3:1 para limite de detecção, a concentração corresponde de SPD poderia ser ainda diluída mais 26 vezes e ser detectada, e considerando-se a relação 10:1 para limite de quantificação a mesma poderia ser diluída mais 8 vezes e ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, conforme tabela 17. Obteve-se

uma média de 66 para a relação sinal/ruído a partir das relações S/N: 76, 71, 53 da concentração 74 pmol/mL de SPM, assim essa solução poderia ser ainda diluída mais 22 vezes e ser passível de detecção fornecendo uma relação 3:1; e diluída mais 6 vezes e ainda ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, de acordo com a tabela 17.

Tabela 17: Limite de Detecção e Quantificação calculados a partir da relação S/N

Concentração	SPD (pmol/mL)			SPM (pmol/mL)		
	97			74		
S/N (3:1)	3,7	3,1	2,3	3,4	3,2	2,4
S/N (10:1)	12,1	10,2	7,6	12,6	11,8	8,8
LD (na coluna)	0,06 pmol $\pm$ 0,7			0,06 pmol $\pm$ 0,5		
LQ (na coluna)	0,20 pmol $\pm$ 2,0			0,22 pmol $\pm$ 2,0		

A metodologia utilizada nesse estudo para detectar e separar as poliaminas dansiladas apresentou-se mais sensível que o método relatado por Smith e Davies (1985) para separação e quantificação de poliaminas em plantas, usando uma coluna de fase reversa C₁₈ ODS Hypersil com um gradiente de metanol:água (60:95%) em 23 minutos, cujas áreas dos picos dos padrões representaram 2,5 pmol. Mostrou-se também mais sensível que o método desenvolvido por Marcé e colaboradores (1995), cujos derivados dansilados foram separados em uma coluna C₁₈ ODS Spheri-5 e eluídos com acetonitrina e água (70:30%) e apresentaram um limite de detecção de 0,5 pmol. Fu e colaboradores (1998) determinando poliaminas em próstata humana, encontraram um limite de detecção de 0,3 pmol, usando uma coluna C₁₈ μ Bondapak e um gradiente linear de metanol:água (80:100%) em 11 minutos.

5.3 Aplicação do Método Cromatográfico para Análise de Poliaminas Ligadas a Naftoquinonas

Os gráficos apresentados a seguir mostram os resultados obtidos após a incubação das naftoquinonas: lapachol e β -lapachona com espermidina e espermina.

Foi observado que houve uma diminuição significativa nas áreas das poliaminas nas amostras que se encontravam complexadas com as naftoquinonas quando comparado às aquelas analisadas individualmente. Verificou-se uma redução de 67% e 50% dos níveis de SPD e SPM respectivamente quando incubadas com o lapachol; e redução de 44% e 37,5% de SPD e SPM quando incubadas com β -lapachona. Em 2006, Cunha e colaboradores relataram o acoplamento de um derivado de espermidina com derivados metolixados de naftoquinonas a 90 °C durante 20 horas e perceberam que as naftquinonas apresentaram-se como um fragmento em potencial para melhorar a atividade da espermidina na inibição das enzimas topoisomerases. Esteves-Souza e colaboradores em 2008 demonstraram que conjugados de poliaminas-naftoquinonas, tiveram sua citotoxicidade aumentada em relação aos compostos originais e ainda foram capazes de induzir apoptose das células leucêmicas humanas HL-60. Nossos dados ressaltam a capacidade da formação do conjugado poliaminas-naftoquinonas sem a necessidade de altas temperaturas e tempo prolongado de reação e reforçam a possibilidade da participação das poliaminas e seus análogos como alternativa na terapia anticâncer, uma vez que esse conjugado poderia agir como análogo dessas amins e competir pelo sítio de ligação das mesmas nas células e assim sua concentração seria reduzida e conseqüentemente os efeitos danosos à célula diminuiriam.

Gráfico 9: Representação esquemática do estudo do acoplamento das amostras espermidina (SPD) e espermina (SPM) com o lapachol. $p < 0,05$ * vs. SPD sem lapachol e # vs. SPM sem lapachol.

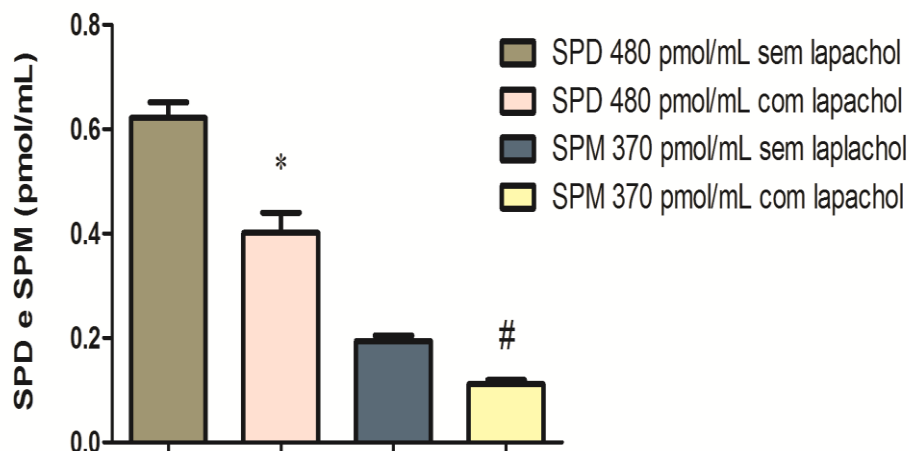
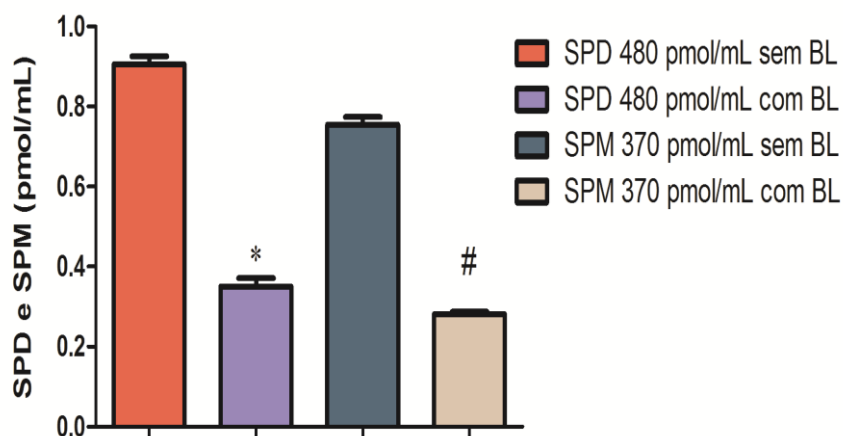


Gráfico 10: Representação esquemática do estudo do acoplamento das amostras espermidina (SPD) e espermina (SPM) com a β -lapachona (BL). $p < 0,05$ * vs. SPD sem β -lapachona e # vs. SPM sem β -lapachona.



As figuras 19 e 20 mostram uma proposta mecanística da reação de acoplamento que ocorre entre o lapachol, a β -lapachona e a espermidina para a formação do possível produto proveniente dessa reação. O mesmo se aplica a espermina.

Figura 21: Proposta mecanística para a formação do possível produto proveniente do acoplamento do lapachol com a espermidina

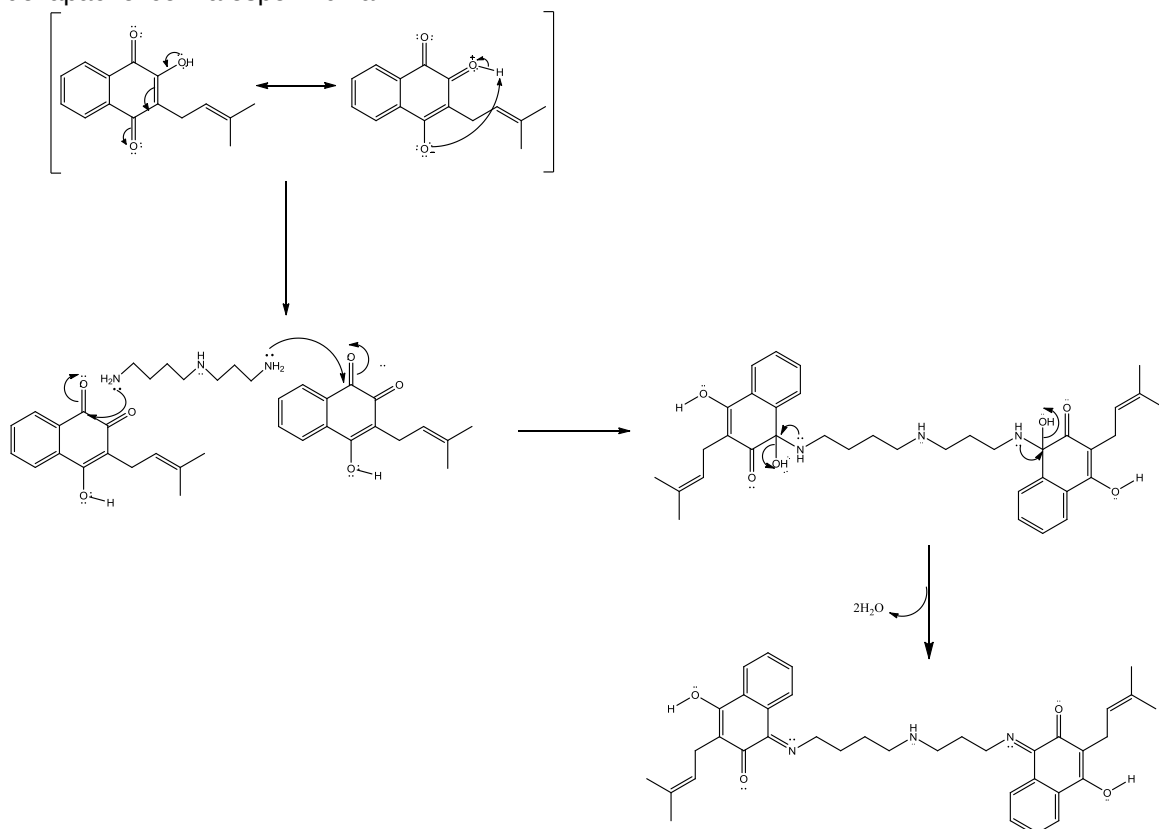
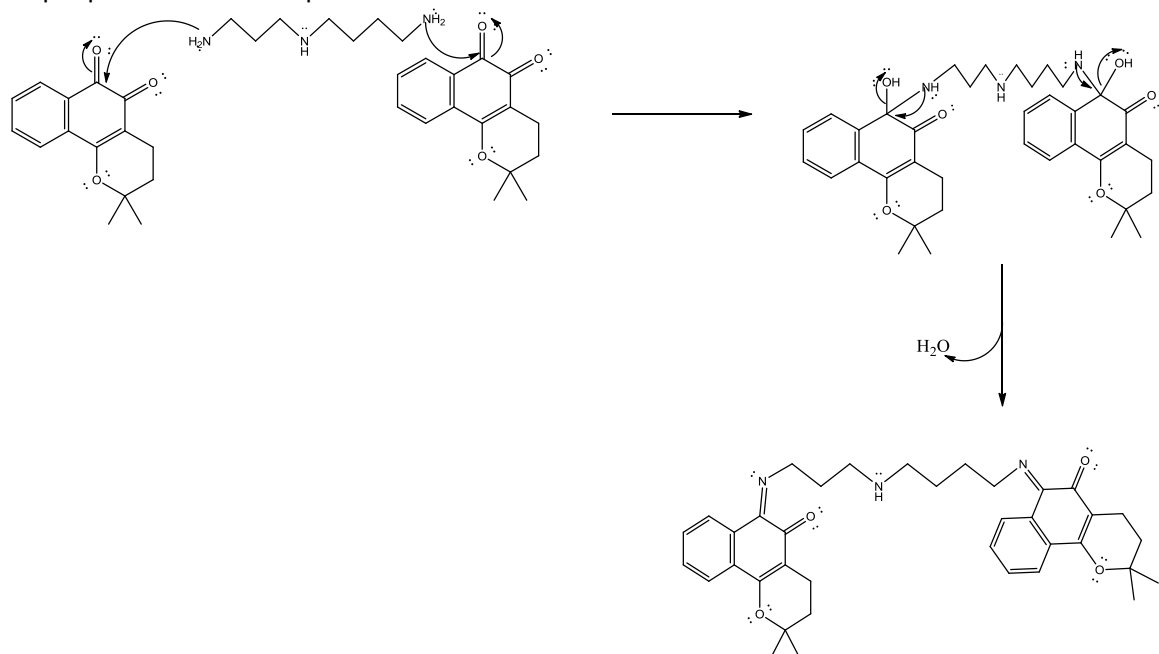


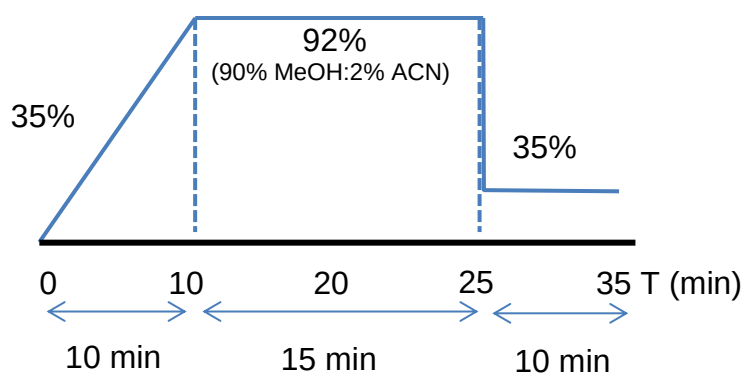
Figura 22: Proposta mecanística para a formação do possível produto proveniente do acoplamento da β -lapachona com a espermidina.



5.4 Aplicação do método cromatográfico desenvolvido à análise de poliaminas em cultura de células tumorais tratadas com β -lapachona

A figura 23 representa o gradiente da fase móvel utilizado para a análise de poliaminas na cultura de células tumorais HL-60 tratadas com β -lapachona, composta por uma mistura de metanol:água (35-90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos

Figura 23: Método gradiente metanol:água (35-90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos



A modificação na fase móvel, no método anteriormente desenvolvido e validado tornou-se necessária para uma melhor separação dos picos em virtude da complexidade da amostra. Diminuiu-se então a porcentagem de solvente orgânico na fase móvel para 92% e acrescentou-se uma porcentagem de 2% de acetonitrila na composição da mesma. Os resultados obtidos podem ser visualizados nos cromatogramas representados nas figuras 24 e 25.

Figura 24: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 330 pmol/mL e 3190 pmol/mL em cultura de células tumorais HL-60 eluídos em modo gradiente com metanol:água (35:90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B)

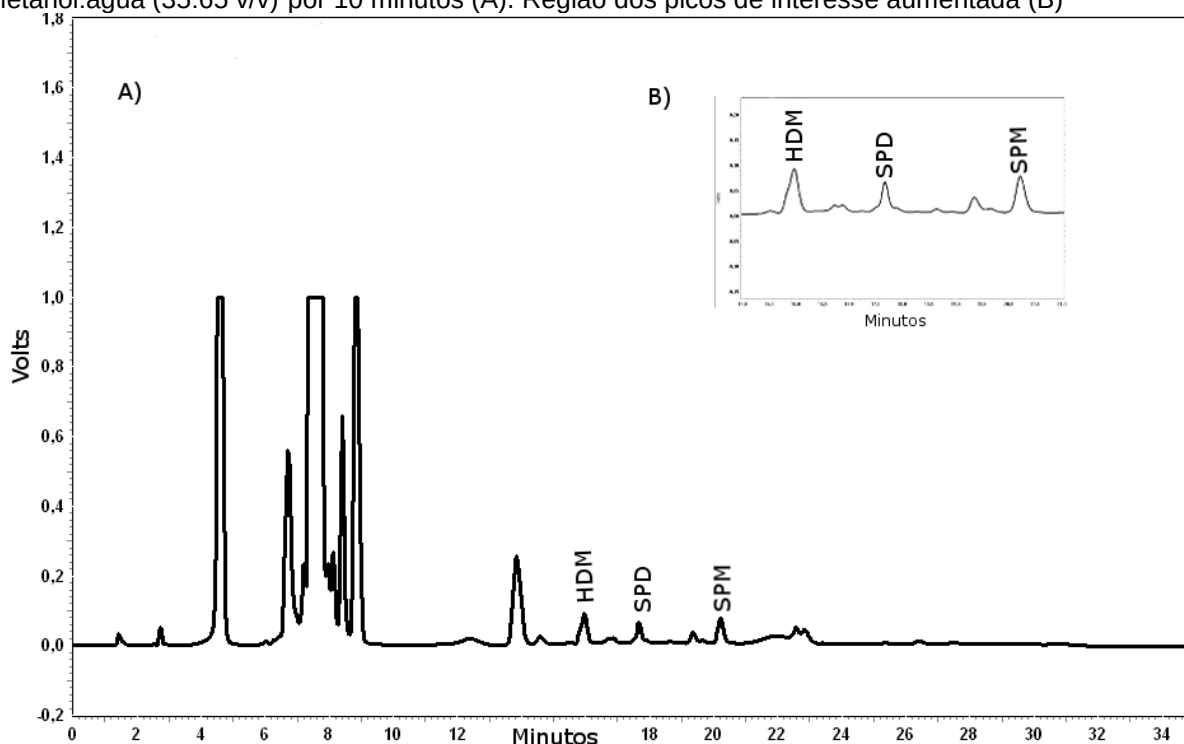
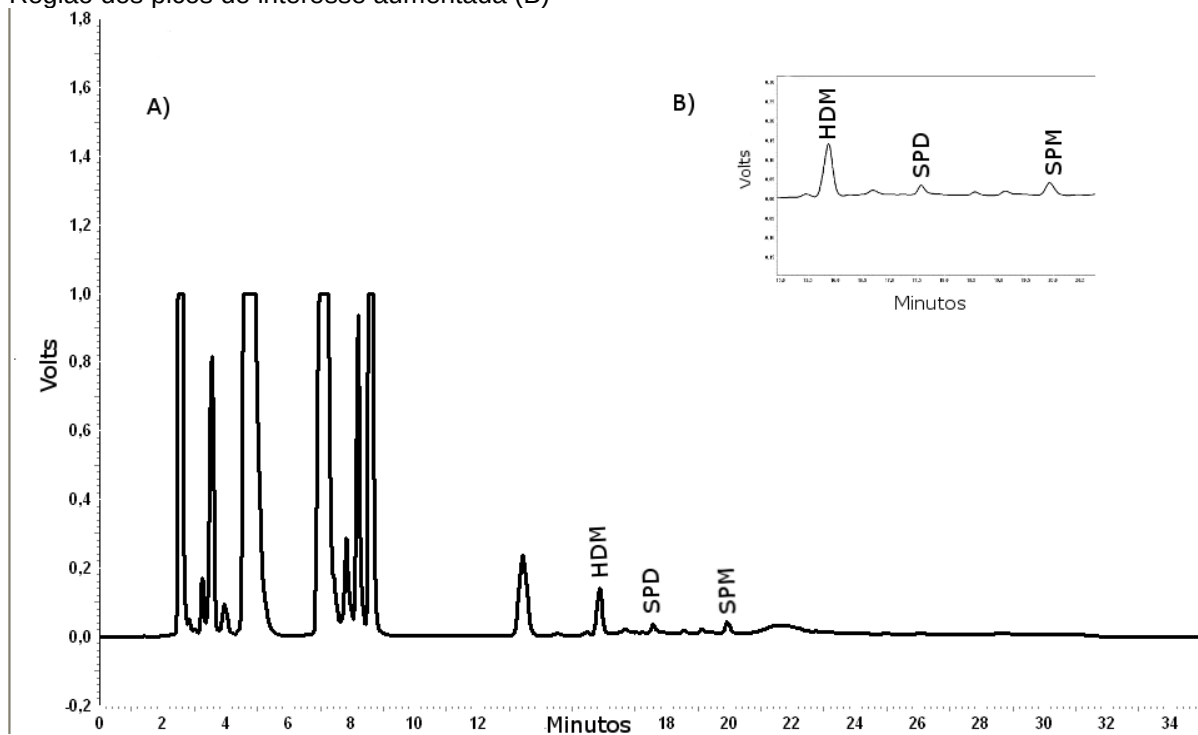


Figura 25: Cromatograma representativo da injeção dos derivados fluorescentes de SPD e SPM 66 pmol/mL e 913 pmol/mL em cultura de células tumorais HL-60 tratadas com 10 mM de β -lapachona eluídos em modo gradiente com Método gradiente metanol:água (35:90 v/v) durante 10 minutos, metanol:acetonitrila:água (90:2:8 v/v) por 15 minutos e metanol:água (35:65 v/v) por 10 minutos (A). Região dos picos de interesse aumentada (B)



Visto que a alteração no método já validado foi apenas um pequeno ajuste na fase móvel, que os outros parâmetros permaneceram iguais e não ocorreu uma diferença considerável no tempo de retenção dos picos de interesse o método pode ser utilizado sem a necessidade de revalidação.

Os gráficos apresentados a seguir mostram os resultados obtidos após a aplicação do método cromatográfico à análise das poliaminas espermidina e espermina em cultura de células tumorais tratadas com β -lapachona.

Gráfico 11: Representação esquemática do estudo do acoplamento de espermidina com β -lapachona em cultura de células (HL-60). $p < 0,001^*$ vs. Controle

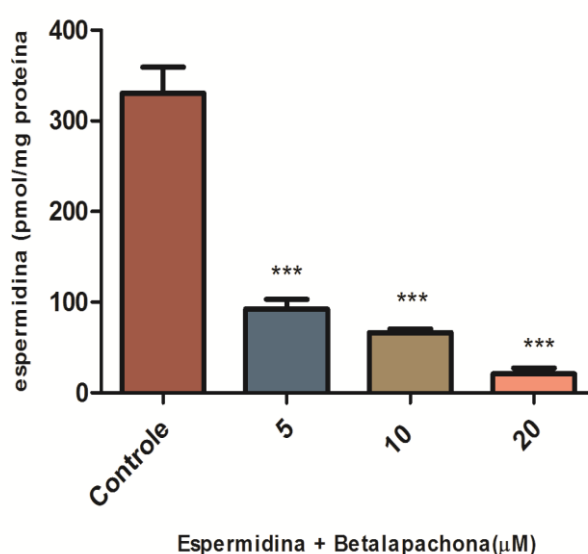
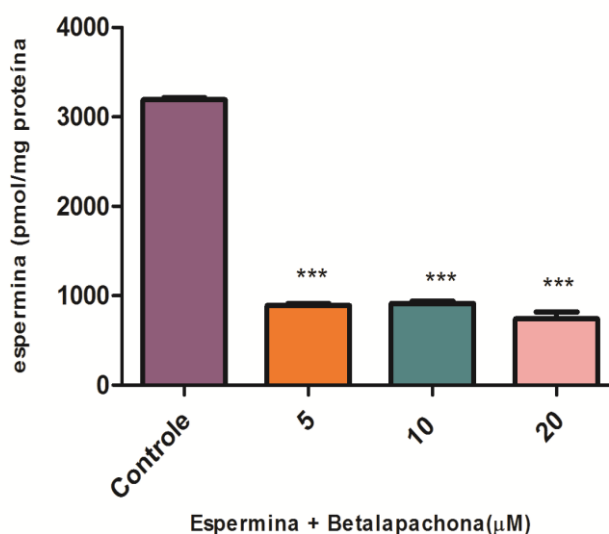


Gráfico 12: Representação esquemática do estudo do acoplamento de espermina com β -lapachona em cultura de células (HL-60). $p < 0,001^*$ vs. Controle.



Os resultados demonstraram que ocorreu uma redução de 72%, 80% e 94% de espermidina quando tratadas com 5, 10 e 20 μ M de β -lapachona respectivamente; e redução de 72%, 71% e 77% de espermina. A atividade citotóxica de amino-lapachol derivados contra carcinoma de Ehrlich e uma linhagem de células leucêmicas humanas (K562) foi investigada por Esteves-Souza e colaboradores em 2007, e observaram que a substituição dos grupamentos hidroxila e metoxila no lapachol por grupos amino levou a um aumento moderado da atividade citotóxica contra células de Ehrlich. Uma biblioteca de 24 conjugados poliaminas-quinonas foi preparada e testada para determinar o potencial antineoplásico de células cancerígenas do cólon (HT29), por Bolognesi e colaboradores (2007), esses autores notaram que todos os membros da biblioteca inibiram a proliferação celular com valores de IC_{50} na faixa de 1-100 μ M. Nossos resultados corroboram com os dados da literatura e enfatizam a hipótese de que a formação dos conjugados de poliaminas-naftoquinonas aumenta a citotoxicidade em relação aos compostos originais e conseqüentemente depleta os níveis celulares das poliaminas, podendo ser devido a ação do conjugado como análogo dessas aminas, competindo pelo sítio de ligação das mesmas nas células ou ainda pela redução dos níveis de poliaminas livres.

6 CONCLUSÕES

- O volume utilizado do solvente extrator (650 μ L) mostrou-se essencial para obtenção dos derivados fluorescentes (poliaminas dansiladas).
- O gradiente de eluição (35:95 v/v) foi fundamental para a separação adequada dos componentes de interesse
- As condições analíticas do método permitiram a detecção das poliaminas com precisão ($\leq 15\%$ para as concentrações média e alta; $\leq 20\%$ para a concentração baixa) e exatidão (91-112% para SPD) e (92-119% para SPM).
- O método mostrou-se linear na faixa linear na faixa de concentração utilizada para SPD (97-970 pmol/mL) e para SPM (74-740 pmol/mL) e também seletivo frente a separação das poliaminas e as proteínas presentes no meio de cultivo celular).
- O método apresentou boa sensibilidade, uma vez que os cálculos dos limites de detecção e quantificação fornecem a comprovação de que o intervalo de concentrações de trabalho escolhido se apresenta capaz de detectar e quantificar os analitos desejados
- É plausível a formação de adutos de poliaminas com naftoquinonas
- Os níveis de poliaminas são depletados (diminuição de 67% e 50% dos níveis de SPD e SPM respectivamente quando incubadas com o lapachol; e diminuição de 44% e 37,5% de SPD e SPM quando incubadas com β -lapachona) em razão das mesmas formarem um complexo com as naftoquinonas a temperatura ambiente.
- O método é adequado à análise de poliaminas em cultura de células tumorais
- Os níveis celulares de poliaminas são depletados (diminuição de 72%, 80% e 94% de espermidina quando tratadas com 5, 10 e 20 μ M de β -lapachona respectivamente; e redução de 72%, 71% e 77% de espermina)

7 PERSPECTIVAS

- Adequar a metodologia analítica desenvolvida à aplicação em material biológico conforme a RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012
- Correlacionar a depleção de poliaminas com a potência antitumoral das naftoquinonas

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. R. D. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal.**, v.2, p. 42-47, 2009.

ALVES, E. A. & GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. *In*: VENÂNCIO, E. P. D. S. J. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro. 2010.

AMARAL, J. B. D.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicações em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia.**, v. 34, p. 1-20. 2011.

ANALYTIX. **Derivatization Reagents.** Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytix-newsletter.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2012.

ARAUJO, A. J. *et al.* Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. **Toxicol In Vitro.**, v. 26, p. 585-94, 2012.

ARAÚJO, M. J. S. M. P. D. **Síntese de poliaminas naturais selectivamente protegidas derivatização e síntese total.** 1995. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto], Porto.

BACHRACH, U. The early history of polyamine research. **Plant Physiol Biochem.**, v. 48, p. 490-5. 2010.

BARFORD *et al.* **Fundamental & Applied Aspects of Animal Cell Cultivation.** Singapore. Coronet Books Inc. 276 p.

BELLAGAMBA, F. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique. **J. Chromatogr. A.**, v. 791, p. 79-84, 1997a.

BOLOGNESI, M.L. *et al.* Parallel Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of a Polyamine-Quinone Conjugates Library. **J. Med. Chem.**, v.51, p.5463–5467, 2008.

BONCHER, T. *et al.* Polyamine-based analogues as biochemical probes and potential therapeutics. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 356-63, 2007.

BONIFAZI, E. L. *et al.* Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorg Med Chem.**, v. 18, p. 2621-2630, 2010.

BRAITHWAITE, A. SMITH., F. J 1996. **Chromatographic Methods**. 5 ed. London: Kluwer Academic Publishers, 571 p.

BRASIL, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 19 abr. 2012

CANN-MOISAN C., CAROFF J. e GIRIN E. Standardization in the determination of red blood cell polyamines by high-performance liquid chromatography. **J. chromatogr.** v. 574, p.134-136,1992.

COLEMAN, C. S. *et al.* Targeted expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase increases susceptibility to chemically induced skin carcinogenesis. **Carcinogenesis.**, v. 23, p. 359–364.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp. 2006

COOPER, G. M. Uma visão geral das células e da pesquisa celular. 3 ed In: ARTMED. **A célula: uma abordagem molecular**. São Paulo. 2007.

CORREIA, P.R.M. **Estudo da utilização de padrão interno em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea**. 2004. [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Instituto de Química], São Paulo.

CRISS, W. E. A Review of Polyamines and Cancer. **Turk J Med Sci.**, v. 33, p. 195-205, 2003.

CUNHA, A. S. *et al.* Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on DNA-topoisomerases I and II- α . **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 439-442, 2006.

DANIELSON, N. D.; GALLAGHER, P. A.; BAO, J. J. Chemical reagents and derivatization procedures in drug analysis, In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of analytical chemistry**. John Wiley & Sons Ltd ed. Chichester, 2000.

DELCROS, J. G. *et al.* Effect of spermine conjugation on the cytotoxicity and cellular transport of acridine. **J Med Chem.**, v. 45, p. 5098-5111, 2002.

DUBIN, M. F.; VILLAMIL, F.; STOPPANI, A. O. M. Citotoxicidad de la beta lapachona: una o-naftoquinona con posibles usos terapeuticos / Cytotoxicity of beta-lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use. **Medicina.**, v. 61, p. 343-350, 2001.

DUCROS, V. *et al.* Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 390, p. 46-51, 2009.

DUVOIX, A. *et al.* Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 1101-1111, 2004.

DE MEY, E. *et al.* Dansyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. **Food Chem.**, v. 130, p. 1017-1023, 2012.

EKEGREN, T.; GOMES-TROLIN, C. Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 338, p. 179-185, 2005.

ESCALABRINO, M. I.; LEGAZ, M. E. High Performance Liquid Chromatography of the Dansyl Derivatives of Putrescine, Spermidine, and Spermine. **Plant Physiol.** v.87, p.519-522, 1988.

ESTEVEZ-SOUZA, A. *et al.* Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, p. 1399-1402, 2007.

_____. Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates. **Oncol Rep**, v. 20, p. 225-31, 2008.

FEITH, D. J., SHANTZ, L. M., PEGG, A. E. Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 61, p. 6073–6081, 2001.

FREI, R. W.; SANTI, W. Derivatization in modern liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 277, p. 303-310, 1975.

FU, S. *et al.* Determination of polyamines in human prostate by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 709, p. 297-300, 1998

GALSTON, A. W.; SAWHNEY, R. K. Polyamines in plant physiology. **J. Plant Physiol.**, v. 94, p. 406-410, 1990.

GEHRKE, C. W.; KUO, K. C.; ZUMWALT, R. W. Determination of polyamines in human urine by an automated ion-exchange method. **J. Chromatogr.**, v. 89, p. 231-238, 1974.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In: Y. H. Hui HUI. **Handbook of food science, technology and engineering**. Marcel Dekker, v 4, p 1-38, 2005.

HAKKINEN, M. R. *et al.* Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 45, p. 625-634, 2007.

HAWEL, L., 3rd.; BYUS, C. V. A streamlined method for the isolation and quantitation of nanomole levels of exported polyamines in cell culture media. **Anal Biochem**, v. 311, p. 127-132, 2002.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. *et al.* Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. **J. Chromatogr. A**, v. 1147, n. 2, p. 192-199, 2007

HIRAMATSU, K. *et al.* An Improved Method of Determining Free and Acetylated Polyamines by HPLC Involving an Enzyme Reactor and an Electrochemical Detector. **J. Biochem.**, v. 115, p. 584-589, 1994.

HUI-MING, M. *et al.* Simultaneous determination of twelve biogenic amines in serum by high performance liquid chromatography. **Microchem. J.**, v. 91, p. 176-180, 2009.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 271, p. 559-564, 2000.

IJIMA, S. *et al.* Optimization of an Online Post-Column Derivatization System for Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) and Its Applications to Analysis of Biogenic Amines. **Anal. Sci.**, v. 29, p. 539-545, 2013.

INGLES, D. L.; GALLIMORE, D. High-performance liquid chromatography of fluorescamine-labelled amines in acid solvents. **J. Chromatogr., A.**, v. 325, p. 346-352, 1985.

JÄNNE, J. *et al.* Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 5, p. 877-94, 2004.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chem.**, v. 90, p. 219-230, 2005.

KAROVICOVA, J.; KOHAJDOVA, Z. Biogenic amines in food. **Chem. Pap.**, v. 59, p. 70-79, 2005.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. 1 ed. New Jersey:Jonh Wiley & Sons, 2007,1080 p.

KHUHAWAR, M. Y.; QURESHI, G. A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **J. Chromatogr. B.**, v. 764, p. 385-407, 2001

KNAPP, D. R. **Handbook of analytical derivatization reactions**. New York: Jonh Wiley & Sons, 1979, 741 p.

KOSKI, P. *et al.* Analysis of Polyamines as their dabsyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 164, p. 261-266, 1987.

KUBOTA, S. *et al.* Urinary Polyamines as a Tumor-Marker. **Cancer Detect. Prev.**, v. 8, p. 189-192, 1985.

KUMI-DIAKA, J. *et al.* Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: Therapeutic synergy in genistein and beta-lapachone combination treatment. **Cancer Cell Int.**, v. 4, p. 5, 2004.

LAGISHETTY, C. V.; NAIK, S. R. Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. **Indian J Pharmacol**, v. 40, p. 121-125, 2008.

LIGIERO *et al.* Comparação entre Métodos de Quantificação em Cromatografia Gasosa: Um Experimento para Cursos de Química. **Quim.nova.**, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009.

LIN, J. K.; LAI, C. C. Chromophoric determination of putrescine, spermidine and spermine with dansyl chloride by high-performance liquid-chromatography and thin-layer chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 227, p. 369-377, 1982.

LINARES, R. M. *et al.* Rapid microwave-assisted dansylation of biogenic amines: Analysis by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 808, p. 87-93, 1998.

LINSALATA, M. *et al.* Prognostic value of tissue polyamine levels in human colorectal carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 2465-2469, 2002.

LOWES *et al.* Recommendations on: internal standard criteria, stability, incurred sample reanalysis and recent 483s by the Global CRO Council for Bioanalysis. **Bioanalysis.**, v. 3, n. 12, p. 1323-1332.

LOZANOV, V. *et al.* Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 860, n. 1, p. 92-7, 2007.

LUSTOSA, C.F. **Correlação entre o consumo de alimentos ricos em poliaminas, tipo de câncer e IMC de pacientes oncológicos.** 2011. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Piauí], Teresina

MARCÉ, M. *et al.* Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. **J. Chromatogr. B.**, v. 666, p. 329-335, 1995.

MARINHO, A. F. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da warifteína em extratos de *cissampelos sympodialis* EICHL (Milona)**. 2008. [Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Paraíba], Paraíba.

MATTOO, A. K. *et al.* Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. **Amino Acids**, v. 38, p. 405-413, 2010.

MENGERINK, Y. Chromatography of polyamines. **J. Chr. Libr.**, v. 70, p. 606-647, 2005.

MINOCHA, R.; LONG, S. Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. **J. Chromatogr., A.**, v. 1035, p. 63-73, 2004.

MINOCHA, S. C.; MINOCHA, R.; ROBIE, C. A. High-performance liquid-chromatographic method for the determination of dansyl-polyamines. **J. Chromatogr.**, v. 511, p. 177-183, 1990.

MINOIS, N.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; MADEO, F. Polyamines in aging and disease. **Aging**, v. 3, p. 716-32, 2011.

MOINARDA, C.; CYNOBERA, L.; BANDTA, J. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 877-94, 2004.

MOLLINS-LEGUA, C. *et al.* Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC. **Analyst.**, v.24, p. 477–482, 1999

MORGAN, D. M. Polyamines. **Essays Biochem.**, v. 23, p. 82-115, 1987.

MUSKIET, F. A. *et al.* Investigation of polyamine metabolism by high-performance liquid chromatographic and gas chromatographic profiling methods. **J Chromatogr B Biomed Appl.**, v. 667, p. 189-98, 1995.

NEWTON, N. E.; OHNO, K.; ABDEL-MONEM, M. M. Determination of diamines and polyamines in tissues by high-pressure liquid chromatography. **J Chromatogr.**, v. 124, p. 277-85, 1976.

NITTA, T.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, N. Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. **Exp. Cell. Res.**, v. 276, p. 120-128, 2002.

OEFFNER, P. J.; WONGYAI, S.; BONN, G. High-performance liquid chromatographic determination of free polyamines in human seminal plasma. **Clin. Chim. Acta.**, v. 205, p. 11-118, 1992.

PALAVAN-ÜNSAL, N. Stress and polyamine metabolism. Bulg. **J. Plant. Physiol.**, v. 21, p. 3-14, 1995.

PASEIRO-CERRATO, R. *et al.* Analytical method for the simultaneous determination of polyfunctional amines used as monomers in the manufacture of food packaging materials. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 40, p. 7105-7109, 2011.

PEGG, A. E.; FEITH, D. J. Polyamines and neoplastic growth. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 295-299, 2007.

PEGG, A. E. *et al.* Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. **Biochem. Soc. Trans.**, v.31, p. 356–360, 2003.

PERES, T. B. Noções Básicas de Cromatografia. **Biológico**, v. 64, p. 227-229, 2002.

PIGNATTI, C. *et al.* Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. **Amino Acids**, v. 27, p. 359-65, 2004.

RAMOT, Y. *et al.* Polyamines and hair: a couple in search of perfection. **Exp Dermatol**, v. 19, p. 784-90, 2010.

RATTENBURY, J. M. *et al.* Separation and quantification of urinary di- and polyamines by gas chromatography with electron capture detection. **Clin Chim Acta.**, v. 95, p. 61-67, 1979.

SABAINI, P. S. **Métodos de análise e determinação de aminas livres e conjugadas em uvas e vinhos**. 2009. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais] Minas Gerais.

SAEKI, Y.; UEHARA, N.; SHIRAKAWA, S. Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high-performance liquid chromatography and its application to human blood. **J Chromatogr**, v. 145, p. 221-229, 1978.

SÁNCHEZ, J. A.; RUIZ-CAPILLAS, C. Application of the simplex method for optimization of chromatographic analysis of biogenic amines in fish. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 234, p. 285-294, 2012.

SANTOS *et al.* New Adducts of Lapachol with Primary Amines. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n 4, p 796-800, 2011.

SAUNDERS, F. R.; WALLACE, H. M. Polyamine metabolism and cancer prevention. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 364-368, 2007.

SCALABRINO, G.; FERIOLI, M. E. Polyamines in mammalian ageing - an Oncological problem, too? a Review. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 26, p. 149-164, 1984.

_____.Degree of enhancement of polyamine biosynthetic decarboxylase activities in human tumors: A useful new index of degree of malignancy. **Cancer Detect. Prev.**, v. 8, p. 11–16, 1985.

SCHAKEL, E. *et al.* Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polyamines as their benzoyleated derivatives: application to P388 cancer cells. **J. Chromatogr. B.**, v. 668, p.189-197, 1995

SEILER, N. Polyamines. **J. Chromatogr.**, v. 379, p. 157-76, 1986.

_____.Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. **Curr. Drug Targets.**, v. 4, p. 565-585, 2003.

_____.Pharmacological aspects of cytotoxic polyamine analogs and derivatives for cancer therapy. **Pharmacol Ther.**, v. 107, p. 99-119, 2005.

SEILER, N.; KNODGEN, B. Chromatography of Dns derivatives on pre-coated high-performance thin-layer chromatographic plates. **J Chromatogr.**, v. 131, p. 109-119, 1977.

SETHI, R. An Improved high performance liquid chromatographic method for identification and quantization of polyamines as benzoylated derivatives. **Am. J. Anal. Chem.**, v. 02, p. 456-469, 2011.

SHAH, H. R *et al.* Beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines. **Eye.**, v. 22, p. 454-60, 2008.

SHALABY, A. R. Multidetecction, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. **Food Chem.**, v. 52, p. 367-372, 1995.

SHIMADZU. **Analytical methods for amino acids.** Disponível em: <<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/53/53intro.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2012.

SILVA, M. Quantitation by HPLC of Amines as Dansyl Derivatives. **J. Chr. Libr.**, v. 70, p. 445-470, 2005.

SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. H. Determination of biogenic amines in leafy vegetables by amino acid analyser. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 198, p. 230-3. 1994.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica.** 8 ed. Madrid:Thomson. 2005, 1026 p

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid.** 3 ed. Chromatography. New Jersey: Jonh Wiley & Sons, 2011, 957 p.

STEVENS, A. P. *et al.* Quantification of intermediates of the methionine and polyamine metabolism by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in cultured tumor cells and liver biopsies. **J. Chromatogr., A.**, v. 1217, p. 3282-3288, 2010.

TABOR, C. W.; TABOR, H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 45, p. 285-306, 1976.

TANG, X., KIM, A. L., FEITH, D. J., *et al.* Ornithine decarboxylase is a target for chemoprevention of basal and squamous cell carcinomas in Ptch1+/- mice. **J. Clin. Invest.**, v.113, p.867–875, 2004.

THOMAS, T. e THOMAS, T. J. Polyamine metabolism and cancer. **J. Cell Mol. Med.**, v.7, p.113–126, 2003.

TONHI, E. *et al.* Stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) based on functionalized inorganic oxide surfaces. **Quim. Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

UEHARA, N. *et al.* Elevated contents of spermidine and spermine in the erythrocytes of cancer-patients. **Cancer**, v. 45, p. 108-111, 1980.

UNICORN. **User Manual Chromatography Software**. Versão 4.0. Edição AA, 2001. Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc18115011AA_20110830204353.pdf. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

URDIALES, J. L.; MEDINA, M.A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, p. 1015-1019, 2001.

VAN DEN BERG, G. KINGMA A.W., MUSKIET F.A. Determination of polyamines in human erythrocytes by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus Detection. **J. Chromatogr.**, v. 415, p. 27-34. 1987.

VENZA, M. *et al.* Determination of polyamines in human saliva by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 757, p. 111-117, 2001.

WALLACE, H. M. The physiological role of the polyamines. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 30, p. 1-3, 2000.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1-14, 2003.

WEISS, T. S. *et al.* Polyamine levels of human colorectal adenocarcinomas are correlated with tumor stage and grade. **Int. J. Col. Dis.**, v. 17, p. 381-387, 2002a.

WEISS, T. S. *et al.* Collagen sandwich culture affects intracellular polyamine levels of human hepatocytes. **Cell Prolif.**, v. 35, p. 257-67, 2002b.

WEISS, T. S. *et al.* Intracellular Polyamine Levels of Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v.10, n.5, p. 529-535, 2004

WERRINGLOER, J. **Device for non-pulsating post-column derivatization.** United States. patent application. US. n. 6281019, 5 abr. 1999, 28 ago. 2001

YATIN, M. Polyamines in living organisms. **J. Mol. Cell. Biol.**, v. 1, p. 57-67, 2002.

YOSHIDA, H. *et al.* Liquid chromatographic determination of polyamines in human urine based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization using 4-(1-pyrene)butanoyl chloride. **Biomed. Chromatogr.**, v.18 p. 687–693, 2004.

YUN, Z.; ZHANG, R. E. HPLC determination of polyamines in the femtomole range. **Biomed Chromatogr.**, v. 2, p. 173-176, 1987.

ZHOU *et al.* Determination of polyamines in serum by high-performance capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 717 p. 345-349, 1995

ZHU, R. H.; KOK, W. T. Post-column derivatization for fluorescence and chemiluminescence detection in capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, p. 985-999, 1998.