



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

SANDRO DE SOUSA LEAL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA QUANTIFICAÇÃO DE IANGAMBINA E SEU EPÍMERO EM
EXTRATOS DE OCOTEA DUCKEI (LAURACEAE)**

**JOÃO PESSOA – PB
2012**

SANDRO DE SOUSA LEAL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA QUANTIFICAÇÃO DE IANGAMBINA E SEU EPÍMERO EM
EXTRATOS DE OCOTEA DUCKEI (LAURACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Segundo orientador: Prof.^a Dr.^a Fábia Cristina Rossetti

JOÃO PESSOA – PB

2012

L435d Leal, Sandro de Sousa.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de langambina e seu epímero em extratos de Ocotea duckei (Lauraceae) / Sandro de Sousa Leal.-- João Pessoa, 2012.

181f. : il.

Orientadores: José Maria Barbosa Filho, Fábia Cristina Rossetti

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais.
2. Ocotea duckei (Lauraceae).
3. langambina.
4. Epímeros.
5. CLAE-DAD - validação.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

SANDRO DE SOUSA LEAL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA QUANTIFICAÇÃO DE IAMGAMBINA E SEU EPÍMERO EM
EXTRATOS DE OCOTEA DUCKEI (LAURACEAE)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Orientador

Prof.ª Dr.ª Fábia Cristina Rossetti
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Segundo Orientador

Prof. Dr. Fábio Santos Souza
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Examinador Externo

Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Examinador Interno

*Dedico a minha família,
Francisco, Aliane e Fábio, por todo
apoio e atenção que me foi dado,
toda educação e amor concedido;
a minha avó **Aliete**, pelo carinho que
tem pelo neto cientista.*

Tua caminhada ainda não terminou...

*A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.*

*Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus, força suprema do universo, Àquele que não podemos compreender por meio da razão e está acima do nosso entendimento, por me amparar nos momentos de dificuldades e consolar minha alma.

Ao meu pai **Francisco Carlos** e minha mãe **Aliane Leal**, por não terem pougado esforços em investir na minha educação, por terem aceitado meus sonhos e minhas vontades, por tudo que fizeram na minha vida para que eu chegasse até aqui; meu irmão **Fábio Leal** e minha avó **Aliete Leal**.

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**, expresso meus sinceros agradecimentos pela orientação deste trabalho, pela liberdade com que permitiu que o mesmo fosse conduzido e por ter me dado a oportunidade de iniciar na pesquisa científica.

À **Prof. Drª Fábia Cristina Rossetti**, uma paulistana que veio se aventurar na Paraíba e se nordestinou, pelo auxílio imprescindível na realização deste trabalho. Mais do que isso, agradeço pela convivência agradável, conselhos, pela troca de experiências, e amizade, que construímos ao longo desse tempo.

Ao **Prof. Dr. Luís Cesar Rodrigues**, agradeço por todos os ensinamentos, na ajuda prestada e orientação nas dúvidas.

Ao **Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho** ou simplesmente Zé Rodrigues por ter me mostrado e ampliado as fronteiras do pensamento científico. Seus ensinamentos contribuíram, e muito, para minha formação.

Ao **Prof. Dr. Fábio Santos Souza**, a personificação do curso de Farmácia Industrial, por todo incentivo na dedicação à pesquisa e pelo entusiasmo com a profissão de Farmacêutico Industrial, a qual aspiro me tornar um dia.

A todos os colegas e amigos do LAFAM, em especial a **Rony, Antônileni, Michelline, Ingrid, Lídia, Ayala e Aline**, pelo companherismo e convivência agradáveis, ajuda nos experimentos e nas dúvidas.

Aos grandes amigos da melhor turma de Mestrado (segundo dados incontestáveis de várias fontes) em especial a **Paula, Fagner, Jaqueline, Ítalo, Abraão, Hellane, Madalena, Monalisa, Ricardo, Patrícia, Carol, Gregório, Sara, Jéssica**, pelas experiências memoráveis que passamos durante o mestrado.

À minha turma de graduação em Farmácia Industrial, em especial aos “brotheres” **Diego Igor e João Guilherme**, pela amizade, força e incentivo para continuar a caminhada profissional; **Hellane Fabrícia e Paula Salgado, Emília Montenegro, Luípa Michelle, Caio Cesar.**

À **Analúcia Guedes Silveira Cabral**, por ter me iniciado no mundo da fitoquímica, obrigado pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo companheirismo e atenção durante todo esse tempo.

Aos colegas e amigos da Fitoquímica, em especial a **Thaís, Daysianne, Narlize, Ana Sílvia, Vivianne, Gabriela, Roosevelt, Karine, Camila, Tainá, Heloísa, Lázaro, Marianne, Steno, Isis, “Manso”, Paula**, muito obrigado pelos momentos de alegria, companheirismo e descontração que tivemos intra e inter-laboratórios, desde os tempos em que fui iniciação científica até hoje.

À **Sócrates Golzio**, uma pessoa exemplar em todos os sentidos, a qual tenho profunda admiração e me espelho, pelos ensinamentos, paciência e orientações nas dúvidas. Agradeço pela amizade firmada na ciência e, da ciência, para a vida; À **Fábio Tenório-Souza**, uma pessoa extremamente carismática, especial e iluminada, agradeço por toda a ajuda, amizade e felicidade constante, que transmite para todos ao seu redor.

A **Cinthia Queiroga**, meu amor, obrigado pelos momentos especiais que passamos e por tornar meus dias mais alegres. Obrigado por preencher de felicidade o meu coração e me fazer perceber que você é muito mais que uma pessoa importante na minha vida, é parte dela.

Aos professores da Pós-Graduação: **Bágönília Araújo, Demétrius Machado, Eduardo de Jesus Oliveira, Josean Fechine e Fátima Vanderlei, Celidarque da Silva Dias**, agradeço pelos ensinamentos e por me fazer entender o que é estar dentro de uma Pós-Graduação.

Aos técnicos: **Nonato, Wellington, Alexsandro, Brizola, Vicente**, pela atenção concedida e ajuda para a realização dos experimentos.

Às secretárias, **Tânia e Carol**, pela disponibilidade sempre que precisei e pela receptividade.

À **UFPB e CNPq**, pelo auxílio financeiro e suporte técnico.

A todos que fizeram parte do antigo **LTF**, guardo com carinho todas as lembranças

RESUMO

A iangambina, lignana furofurânicã isolada de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae), possui importantes atividades farmacológicas, como antagonista seletivo do fator de agregação plaquetária (PAF), ações protetoras cardiovasculares, depressora do SNC, dentre outras. Além disso, se apresenta como o marcador fitoquímico da espécie e é uma substância promissora para o desenvolvimento de um fitofármaco. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologia analítica em CLAE-DAD para a quantificação simultânea da iangambina e seu epímero, *epi*-iangambina, nos extratos e frações de *Ocotea duckei*. Para o desenvolvimento do método, elaborou-se uma proposta sintética para obtenção das lignanas com grau de pureza elevado. A rota sintética utiliza processo de biotransformação através da peroxidase da água de coco para a síntese da iangambina de modo estereoseletivo. As condições do método cromatográfico desenvolvido foram: coluna de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), como fase móvel uma mistura de água e acetonitrila (50:50), a um fluxo de 1 mL/min, detecção no comprimento de onda de 215 nm. As lignanas foram isoladas do extrato etanólico bruto da planta (folhas e casca do caule) através de metodologia de isolamento para lignóides. Os epímeros foram separados através de CLAE-DAD semi-preparativa, obtendo-se os marcadores livres de impurezas, sendo caracterizados por métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C), Infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM), rotação ótica, dicroísmo circular, além de técnicas termoanalíticas. A validação da metodologia analítica foi realizada de acordo com a Resolução RE nº 899/2003 da ANVISA, mostrando-se ser: seletivo para os dois epímeros, linear na faixa de concentração de 1-60 µg/mL, preciso ($\text{CV} \leq 5\%$), exato (99-101%) e robusto. A aplicação da metodologia analítica num estudo quantitativo permitiu estabelecer que em 1,0g do extrato das cascas do caule e folhas tem-se cerca de 58,07 mg de iangambina e 88,94 mg de *epi*-iangambina. Na fração de lignóides totais, para cada 1,0g tem-se 188,75 mg de iangambina e 250,02 mg de *epi*-iangambina.

Palavras-chave: *Ocotea duckei* (Lauraceae), Síntese, Iangambina, epímeros Validação, CLAE-DAD.

ABSTRACT

Yangambin, a furofuran lignan isolated from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) has important pharmacological activities, such as selective antagonist of platelet activating factor (PAF), cardiovascular protective effects, CNS depressant, and others. Besides, it is presented as a phytochemical marker of the specie and a promising substance for a herbal drug development. Thus, this study aimed at the development and validation of an analytical method on HPLC-DAD for simultaneous quantitative determination of yangambin and its epimer, *epi*-yangambin, in extracts and fractions of *Ocotea duckei*. For method development, a synthetic approach was made in order to obtain the lignans with high purity. The synthetic route includes a biotransformation process with coconut water peroxidase for a stereoselective synthesis of yangambin. The chromatographic conditions for the study were: reverse phase column C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), mobile phase was a mixture of water and acetonitrile (50:50) at a flow rate of 1,0 mL/min, detection at a wavelength of 215 nm. Lignans were isolated from crude ethanolic extract of the plant (leaves and stem bark) through a lignoids isolation procedure. Epimers were separated by semi-preparative HPLC-DAD to yield compounds free from impurities, being characterized by spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR), infrared (IR), mass spectrometry (MS), optical rotation, circular dichroism, and thermal analysis. Validation of analytical method was performed in accordance with Resolution nº 899/2003, from ANVISA, proving to be: selective for the two epimers, linear at the concentration range of 1,0 – 60,0 µg/mL, precise (CV ≤ 5%), accurate (99-101%) and robust. Application of the validated analytical method in a quantitative study allowed to determine that each 1,0g of crude ethanolic extract from stem bark and leaves presents 58,07 mg of yangambin and 88,94 mg of *epi*-yangambin. In total lignoids fraction, each 1,0g has 188,75 mg of yangambin and 250,02 mg of *epi*-yangambin.

Keywords: *Ocotea duckei* (Lauraceae), Synthesis, Yangambin, epimers, validation, HPLC-DAD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da família Lauraceae no mundo -----	30
Figura 2 – Distribuição das espécies de Ocotea por domínio fitogeográfico -----	32
Figura 3 - A espécie <i>O.duckei</i>, com detalhe das folhas, inflorescências e tronco -----	34
Figura 4 - Rota biossintética para a formação dos precursores das lignanas -----	40
Figura 5 - Estruturas de ressonância dos radicais fenilpropanoídicos-----	40
Figura 6 - langambina e seu epímero, epi-iangambina -----	42
Figura 7 – Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-1 -----	57
Figura 8 – Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-2. -----	59
Figura 9 - Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-3. (R) Reagente; (P) Produto -----	60
Figura 10 - Espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-1 (CDCl_3, 200 MHz). -----	62
Figura 11 - Expansão do espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-1 na região de 7,7 a 6,0 ppm (CDCl_3, 200 MHz). -----	63
Figura 12 - Expansão do espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-1 na região de 4,0 a 3,5 ppm (CDCl_3, 200 MHz). -----	63
Figura 13 - Espectro de ^{13}C-RMN (APT) do produto de #SL-1 (CDCl_3, 125 MHz).-----	64
Figura 14 - Espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-2 (CDCl_3, 200 MHz). -----	65
Figura 15 - Expansão do espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-2 na região de 7,8 a 3,6 ppm (CDCl_3, 200 Mhz). -----	65
Figura 16 - Espectro de ^{13}C-RMN (APT) do produto de #SL-2 (CDCl_3, 125 MHz).-----	66
Figura 17 - Espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-3 (CDCl_3, 500 MHz). -----	67
Figura 18 - Expansão do espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-3 na região de 7,3 a 5,8 ppm (CDCl_3, 500 MHz).-----	67
Figura 19 - Expansão do espectro de ^1H-RMN do produto de #SL-3 na região de 5,0 a 3,0 ppm (CDCl_3, 500 MHz).-----	68
Figura 20 – Mecanismo da ruptura da parede celular vegetal: (a) ruptura devido à cavitação, (b) difusão do solvente pela estrutura celular -----	76

Figura 21 – Cromatogramas do EEB de <i>O.duckei</i>, em sistema gradiente de MeCN: H₂O (5 a 95%) durante 60,0 min.	-----	83
Figura 22 – Cromatogramas dos EEB de <i>O.duckei</i> de duas coletas diferentes (F10 e A11), na concentração de 100 µg/mL e sistema de eluição MeCN:H₂O (50:50).	-----	85
Figura 23 – Cromatograma do sobrenadante da FLT de <i>O.duckei</i>, obtida pela marcha de lignóides	-----	86
Figura 24 - Cromatograma do extrato aquoso acético desengordurado, da marcha de lignóides de <i>O.duckei</i>.	-----	87
Figura 25 - Cromatogramas das fases de <i>O.duckei</i> obtidas por ELL. (A) Fase hexânica; (B) Fase diclorometano; (C) Comparaçao das extrações ELL x Marcha de lignóides (FLT)	-----	89
Figura 26 - Cromatogramas das fases de <i>O.duckei</i> obtidas por Soxhlet. (A) Fase hexânica; (B) Fase diclorometano; (C) Comparaçao das extrações Soxhlet x Marcha de lignóides (FLT)	-----	91
Figura 27 - Esquema básico de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). (a) Reservatório da fase móvel; (b) Bomba; (c) autoinjetor ou injetor manual; (d) coluna; (e) detector; (f) sistema controlador (SNYDER et. al., 2010).	-----	95
Figura 28 – Cromatogramas da subfração 14-46 da FLT, obtidas durante o desenvolvimento do método.	-----	106
Figura 29 – Cromatogramas da subfração 14-46 da FLT. (a) Fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (40:40:20); (b) Fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (40:30:30); (c) Fase móvel H₂O:MeCN:MeOH (40:20:40)	-----	107
Figura 30 – Cromatograma da FLT, na concentração de 40,0 mg/mL, em sistema de eluição MeCN:H₂O (40:60)	-----	108
Figura 31 – Sobreposição dos espectros na região de UV/Vis (detector de arranjo de diodos) de 190 a 400 nm dos epímeros, na concentração de 100 µg/mL.	-----	109
Figura 32 – Análise do perfil de pureza em CLAE-DAD para os picos 2 e 3, na concentração de 100 µg/mL. (a) Cromatograma; (b) Cromatograma 3D; (c) Peak profile; (d) Peak purity; (e) Similaridade em três pontos	-----	110
Figura 33 - Espectros de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) dos epímeros. (a) FLT-pico 2; (b) FLT – pico 3; (c) Sobreposição dos espectros (em azul, pico 2; em preto, pico 3)	-----	112
Figura 34 - Espectro de ¹H-RMN de FLT-Pico 2 (CDCl₃, 500 MHz)	-----	116
Figura 35 – Espectro de ¹³C- RMN (APT) de FLT-Pico 2 (CDCl₃, 125 MHz)	-----	117

Figura 36 – Expansão do espectro de ^1H-RMN de FLT-Pico 2 (CDCl_3, 500 MHz), na região de 4,8 a 3,0 ppm -----	118
Figura 37 – Expansão do espectro de ^{13}C- RMN (APT) de FLT-Pico 2 (CDCl_3, 125 MHz) na região de 105,0 a 50,0 ppm -----	118
Figura 38 - Espectro de ^1H-RMN de FLT-Pico 3 (CDCl_3, 500 MHz)-----	119
Figura 39 - Espectro de ^{13}C- RMN (APT) de FLT-Pico 3 (CDCl_3, 125 MHz) -----	120
Figura 40 – Expansão do espectro de ^1H-RMN de FLT-Pico 3 (CDCl_3, 500 MHz) na região de 5,0 a 2,8 ppm.-----	121
Figura 41 – Expansão do espectro de ^{13}C- RMN (APT) de FLT-Pico 3 (CDCl_3, 125 MHz) na região de 160,0 a 100,0 ppm. -----	121
Figura 42 - Espectro de massas (fragmentação) da iangambina, obtido através de ionização por eletrospray, em modo positivo (ESI^+) -----	122
Figura 43 – Espectro de massas (fragmentação) da epi-iangambina, obtido através de ionização por eletrospray, em modo positivo (ESI^+) -----	123
Figura 44 – Curvas TG (em preto) e DTA (em azul) da iangambina -----	125
Figura 45 - Curvas TG (em preto) e DTA (em azul) da epi-iangambina-----	125
Figura 46 - Espectros de dicroísmo circular da iangambina (1) e epi-iangambina (2) -----	127
Figura 47 – Análise da seletividade do método para iangambina (à esquerda) e epi-iangambina (à direita). (a) Cromatograma “Contour”; (b) Cromatograma; (c) Curva de pureza (peak purity) -----	141
Figura 48 – Análise da seletividade do método para iangambina e epi-iangambina. (a) Cromatograma do EEB; (b) Cromatograma da FLT -----	142
Figura 49 – Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise.-----	144
Figura 50 - Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise. -----	145
Figura 51 - Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise. -----	146
Figura 52 – Regressão linear da curva média de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina -----	147

Figura 53 – Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade, obtido a partir da curva média de calibração -----	148
Figura 54 – Cromatogramas sobrepostos da iangambina e epi-iangambina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (1,0 – 60,0 ug/mL) -----	148
Figura 55 – Curvas de precisão da iangambina e epi-iangambina, demonstrando a relação exponencial da precisão e concentração.-----	151
Figura 56 – Resultados do estudo de estabilidade em solução para a iangambina-----	155
Figura 57 - Resultados do estudo de estabilidade em solução para a epi-iangambina ----	156
Figura 58 – Cromatogramas do estudo de degradação ácida e básica. (a) Solução padrão; (b) Solução após degradação com HCl 0,1M; (c) Solução após degradação com NaOH 0,1M -----	158
Figura 59 – Curvas de calibração das duas lignanas para aplicação no estudo quantitativo -----	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas da iangambina -----	45
Tabela 2 – Dados espectrais de 1H e ^{13}C-RMN do produto de #SL-1.-----	62
Tabela 3 - Dados espectrais de 1H e ^{13}C-RMN do produto de #SL-2. -----	64
Tabela 4 - Dados espectrais de 1H-RMN do produto de #SL-3.-----	66
Tabela 5 - Parâmetros avaliados no processo de extração por ultrassom-----	81
Tabela 6 – Condições cromatográficas para análise das fases e frações de <i>O.duckei</i>-----	82
Tabela 7 – Perfil cromatográfico do EEB de <i>O.duckei</i> em sistema gradiente MeCN: H_2O (5 a 95%)-----	84
Tabela 8 – Valores das áreas dos picos IAN e EPI-IAN nas fases hexânica, diclorometano (ELL) e FLT (marcha de lignóides).-----	88
Tabela 9 - Valores das áreas dos picos IAN e EPI-IAN nas fases hexânica, diclorometano (Soxhlet) e FLT (marcha de lignóides). -----	90
Tabela 10 – Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD-----	100
Tabela 11 – Valores do ponto de fusão em °C para FLT-pico 2 e FLT-pico 3 -----	113
Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) da iangambina e epi-iangambina em $CDCl_3$ e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)-----	114
Tabela 13 - Dados de RMN de 1H (500 MHz) da iangambina e epi-iangambina em $CDCl_3$ e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)-----	115
Tabela 14 – Variações do método utilizadas para avaliação da robustez -----	138
Tabela 15 – Resultados da curva de calibração do primeiro dia de análise-----	144
Tabela 16 - Resultados da curva de calibração do segundo dia de análise-----	145
Tabela 17 - Resultados da curva de calibração do terceiro dia de análise -----	146
Tabela 18 – Resultados da curva média de calibração-----	147
Tabela 19 – Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise ($n = 5$) -----	150
Tabela 20 - Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise ($n = 5$)-----	150

Tabela 21 - Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise ($n = 5$) -----	150
Tabela 22 - Resultados da precisão inter-dias (precisão intermediária) para a iangambina e epi-iangambina ($n = 3$) -----	151
Tabela 23 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise ($n = 5$) -----	152
Tabela 24 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise ($n = 5$)-----	152
Tabela 25 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise ($n = 5$) -----	152
Tabela 26 - Resultados da exatidão inter-dias para a iangambina e epi-iangambina ($n = 3$) -----	153
Tabela 27 – Resultados do estudo de degradação ácida e básica da iangambina e epi-iangambina -----	157
Tabela 28 – Resultados da quantificação da iangambina e epi-iangambina no extrato etanólico bruto (EEB) e fração de lignóides totais (FLT) de <i>O.duckei</i> -----	160
Tabela 29 – Quantidades em massa da iangambina (Ian) e epi-iangambina (Epi) nos extratos e frações de <i>O.duckei</i> .-----	160

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Proposta de síntese das lignanas furofurânicas segundo Barbosa-Filho et al. (PRONEX 97) -----	50
Esquema 2 – Rota sintética desenvolvida durante o projeto para a síntese da iangambina. -----	51
Esquema 3 – Nova rota sintética para síntese estereoseletiva da iangambina -----	71
Esquema 4 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB F10) de Ocotea duckei Vattimo -----	79
Esquema 5 – Marcha de isolamento dos lignóides totais de O.duckei -----	80
Esquema 6 – Obtenção da iangambina e epi-iangambina através de CLAE-DAD semi preparativa -----	101
Esquema 7 – Proposta de fragmentação de massas da iangambina, utilizando ionização por eletrospray em modo positivo -----	123
Esquema 8 - Preparo das soluções para a validação da metodologia analítica -----	135
Esquema 9 – Mapa esquemático das atividades desenvolvidas durante o projeto -----	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A11	Coleta vegetal realizada em Abril de 2011
ADP	Adenosina difosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	<i>Attached Proton Test</i>
C₁₈	Octadecilsilano
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de espectrometria de massas
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
CV	Coeficiente de variação
d	Duplo
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo duplo
DP	Desvio padrão
DP_a	Desvio padrão do intercepto com o eixo dos Y
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EEB	Extrato Etanolílico Bruto
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
EPI-IAN	<i>Epi</i> -iangambina
ESI	Ionização por Eletrospray
FLT-IAN	Iangambina obtida por precipitação da fração de lignoides totais
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High performance liquid chromatography
IAN	Iangambina

IC	Inclinação da curva de calibração
iNOS	Sintase de óxido nítrico indutível
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPS	Lipopolissacarídeo
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
m	Multipleto
m/z	Razão massa/carga
n	Número de replicatas
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina
nm	Nanômetro
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAL	Fenilalanina-amônia-liase
pKa	Constante de dissociação ácida
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
r²	Coeficiente de correlação linear
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
R_s	Resolução
s	Simpleto
SAR	Relação estrutura – atividade
sl	Simpleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
t.a.	Temperatura ambiente
TG	Termogravimetria
TGA	Análise termogramétrica
T_r	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultravioleta na faixa do visível

WHO World Health Organization
δ Deslocamento químico em PPM

SUMÁRIO

<i>Introdução</i>	26
<i>Objetivos</i>	28
Capítulo I - Ocotea duckei e langambina	
I.1. A Família Lauraceae	30
I.2 O Gênero Ocotea	31
I.3 A Espécie <i>Ocotea duckei</i> Vattimo	33
I.4 Lignóides	36
I.4.1 Nomenclatura, Estrutura e Propriedades.....	36
I.4.2 Aspectos Biossintéticos	39
I.5 <i>langambina</i>	42
Capítulo II - Síntese da langambina	
II. 1 Introdução	48
II.2 Parte Experimental.....	52
II.2.1 Especificação de Materiais e Métodos.....	52
II.2.2 Preparação do éster do ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (#SL-1)	53
II.2.3 Preparação do éster do ácido <i>p</i> -hidroxi-ferúlico (#SL-2).....	54
II.2.4 Preparação do álcool sinapílico (#SL-3)	55
II.2.5 Preparação do siringaresinol (#SL-4)	56
II.3 Resultados e Discussão.....	57
II.3.1 Reação #SL-1	57
II.3.2 Reação #SL-2	58
II.3.3 Reação #SL-3.....	59
II.3.4 Síntese #SL-4	61
II.3.5 Espectros das substâncias sintetizadas	62
II.4 Perspectivas.....	69

Capítulo III - Desenvolvimento e Avaliação dos Métodos de extração

<i>III.1 Fundamentação Teórica.....</i>	73
<i>III.1.1 Aspectos gerais dos processos de extração.....</i>	73
<i>III.1.2 Extração Líquido-Líquido (ELL)</i>	74
<i>III.1.3 Extração por Soxhlet.....</i>	74
<i>III.1.4 Extração por Ultrassom</i>	75
<i>III.2 Parte Experimental.....</i>	77
<i>III.2.1 Coleta e identificação do material vegetal</i>	77
<i>III.2.2 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB)</i>	77
<i>III.2.3 Extração Líquido-líquido (ELL)</i>	78
<i>III.2.4 Marcha de isolamento de lignóides.....</i>	78
<i>III.2.5 Extração por Soxhlet.....</i>	81
<i>III.2.6 Extração por Ultrassom</i>	81
<i>III.2.7 Análises Cromatográficas</i>	81
<i>III. 3 Resultados e Discussão</i>	83
<i>III.3.1 Perfil do EEB de Ocotea duckei.....</i>	83
<i>III.3.2 Marcha de isolamento de lignóides.....</i>	86
<i>III.3.2 Comparação dos métodos de extração</i>	87

Capítulo IV - Desenvolvimento do método cromatográfico, Isolamento e Caracterização

<i>IV.1 Fundamentação teórica</i>	93
<i>IV.1.1 Cromatografia.....</i>	93
<i>IV.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	94
<i>IV.1.2.1 Conceito, aplicações e operação</i>	94
<i>IV.1.2.2 Desenvolvimento de métodos cromatográficos em CLAE</i>	95
<i>IV.1.2.3 Clae semi-preparativa.....</i>	96
<i>IV.1.3 Análise cromatográfica de lignanas.....</i>	97
<i>IV. 2 Parte experimental.....</i>	99
<i>IV.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)</i>	99
<i>IV.2.1.2 Desenvolvimento do método cromatográfico</i>	99
<i>IV.2.1.3 Isolamento dos epímeros em CLAE-DAD semi-preparativa</i>	100

<i>IV.2.2 Caracterização da iangambina e epi-iangambina.....</i>	102
<i>IV.2.2.1 Ultravioleta (UV-Vis) e perfil de pureza cromatográfico</i>	102
<i>IV.2.2.2 Infravermelho</i>	102
<i>IV.2.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C</i>	103
<i>IV.2.2.4 Espectrometria de massas.....</i>	103
<i>IV.2.2.5 Ponto de Fusão.....</i>	103
<i>IV.2.2.6 Termogravimetria (TG) e Análise térmica diferencial (DTA) .</i>	104
<i>IV.2.2.7 Rotação ótica e Dicroísmo circular</i>	104
<i>IV.3 Resultados e discussão</i>	105
<i>IV.3.1 Desenvolvimento do método cromatográfico</i>	105
<i>IV.3.2. Isolamento dos epímeros em CLAE-DAD semi-preparativa.....</i>	108
<i>IV.3.3 Caracterização da iangambina e epi-iangambina.....</i>	108
<i>IV.3.3.1 Ultravioleta (UV-Vis) e perfil de pureza cromatográfico</i>	109
<i>IV.3.3.2 Infravermelho (IV)</i>	111
<i>IV.3.3.3 Ponto de fusão.....</i>	113
<i>IV.3.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C</i>	113
<i>IV.3.3.5 Espectrometria de massas.....</i>	122
<i>IV.3.3.6 Termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA)..</i>	124
<i>IV.3.3.7 Rotação ótica e dicroísmo circular</i>	126

Capítulo V - Validação da metodologia analítica e Quantificação dos epímeros

<i>V.1. Fundamentação teórica</i>	129
<i>V.1.1 Validação de métodos analíticos.....</i>	129
<i>V.1.1.1 Seletividade / especificidade.....</i>	130
<i>V.1.1.2 Linearidade</i>	130
<i>V.1.1.3 Precisão.....</i>	131
<i>V.1.1.4 Exatidão.....</i>	131
<i>V.1.1.5 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)</i>	132
<i>V.1.1.6 Robustez.....</i>	132
<i>V.1.2 Validação no controle de qualidade de fitoterápicos</i>	133
<i>V.2. Parte Experimental</i>	134
<i>V.2.1 Instrumentação e condições analíticas.....</i>	134

V.2.2 Preparo das soluções de trabalho	135
V.2.3 Validação da metodologia analítica	136
V.2.3.1 Seletividade	136
V.2.3.2 Linearidade	136
V.2.3.3 Precisão e Exatidão	136
V.2.3.4 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	137
V.2.3.5 Robustez.....	137
V.2.4 Estabilidade em solução da iangambina e epi-iangambina.....	138
V.2.5 Degradação ácida e básica	138
V.2.6 Determinação quantitativa da iangambina e epi-iangambina	139
V.2.7 Análise estatística.....	139
V.3. Resultados e Discussão.....	140
V.3.1 Seletividade	140
V.3.2 Linearidade.....	143
V.3.3 Precisão e Exatidão.....	149
V.3.4 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	153
V.3.5 Robustez	153
V.3.6 Estabilidade em solução da iangambina e epi-iangambina	154
V.3.7 Degradação ácida e básica	156
V.3.8 Determinação quantitativa da iangambina e epi-iangambina	159
Conclusão.....	163
Referências	166

Introdução e Objetivos

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas e produtos naturais com potencialidades terapêuticas é uma prática antiga, fundamentada na medicina popular. A partir da experimentação e aplicação das plantas medicinais para prevenir e tratar diversas doenças, o homem percebeu o potencial das substâncias naturais, que apresentavam importantes atividades biológicas. Já no início do século XIX, F. W. Serturner isolou a morfina do ópio, o que possibilitou uma nova visão dos produtos naturais, sendo então comercializados na forma de medicamentos. (DREWS, 2000).

Assim, deram-se início a pesquisas científicas que buscavam esse potencial e diversidade química dos produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (BAKER et al., 2007). A partir de meados do século XX, com os avanços recentes na indústria de antibióticos, as plantas medicinais passaram a ganhar espaço no mercado farmacêutico, assumindo o caráter de produto fitoterápico. Este fato está relacionado ao aprimoramento da tecnologia farmacêutica, o que permitiu melhor controle de qualidade de fármacos baseado na moderna tecnologia de identificação, determinação e quantificação de compostos e substâncias químicas, tornando possível a fabricação de fitofármacos seguros, eficazes e de efeito totalmente reproduzível. (YUNES et al., 2001).

De acordo com dados da WHO (2011) - *World Health Organization*, entre 70 a 95% da população na maioria dos países em desenvolvimento, especialmente na Ásia, África e América Latina, utiliza a medicina tradicional no cuidado primário da saúde, envolvendo o uso de ervas e preparações vegetais. As substâncias de origem vegetal representam uma alternativa de menor custo para a população que, em sua maioria, não tem poder aquisitivo ou acesso à medicina assistencial. Diante da necessidade cada vez maior por medicamentos e considerando-se o seu elevado custo, a busca por fontes alternativas de agentes terapêuticos e a implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais é de grande interesse para a comunidade científica (SANTOS, 2002).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (BRASIL, 2006). No entanto, o aproveitamento dessa biodiversidade

para a produção de medicamentos à base de plantas ainda é muito escasso no país, constituindo-se numa tarefa complexa, devido à dificuldade de integração das diversas áreas do conhecimento necessárias para completar a cadeia de produção dos fitomedicamentos. Nesta área, destaca-se a Química de Produtos Naturais, que desempenha um papel importante na investigação das plantas utilizadas na medicina tradicional (BASSANI et al., 2005)

Os processos científicos envolvidos para a transformação de uma planta medicinal em um medicamento devem priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e, por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, a produção do fitoterápico requer, necessariamente, estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agronômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias de análise. (KLEIN et al., 2009). Nesse sentido, faz-se necessário o processo de padronização do fitoterápico, com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato vegetal, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade adequada também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID et al., 2004).

Diante da situação apresentada e reconhecendo-se a rica biodiversidade do Nordeste brasileiro, com sua grande variedade de plantas medicinais, tomou-se como objeto de estudo a espécie *Ocotea duckei* Vattimo, planta pertencente à família Lauraceae. Os estudos com a espécie demonstraram grande potencial do ponto de vista farmacológico e químico, particularmente associados à iangambina, uma lignana considerada marcador fitoquímico da espécie. Assim, evidencia-se um futuro promissor para o desenvolvimento fitoterápico de *Ocotea duckei*.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do marcador fitoquímico iangambina e seu epímero, *epi*-iangambina em extratos e frações de *Ocotea duckei*, através de isolamento e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

ESPECÍFICOS

- 1) Desenvolver uma rota sintética para obtenção da iangambina em grau de pureza elevado;
- 2) Isolamento, purificação e caracterização físico-química da iangambina e *epi*-iangambina;
- 3) Avaliar métodos de extração para obtenção dos marcadores;
- 4) Desenvolvimento de um método de análise e isolamento dos epímeros em cromatografia líquida de alta eficiência
- 5) Validar o método desenvolvido segundo Resolução nº899/2003 (ANVISA);
- 6) Aplicação do método na quantificação dos marcadores nos extratos e frações de *Ocotea duckei*.

Capítulo I

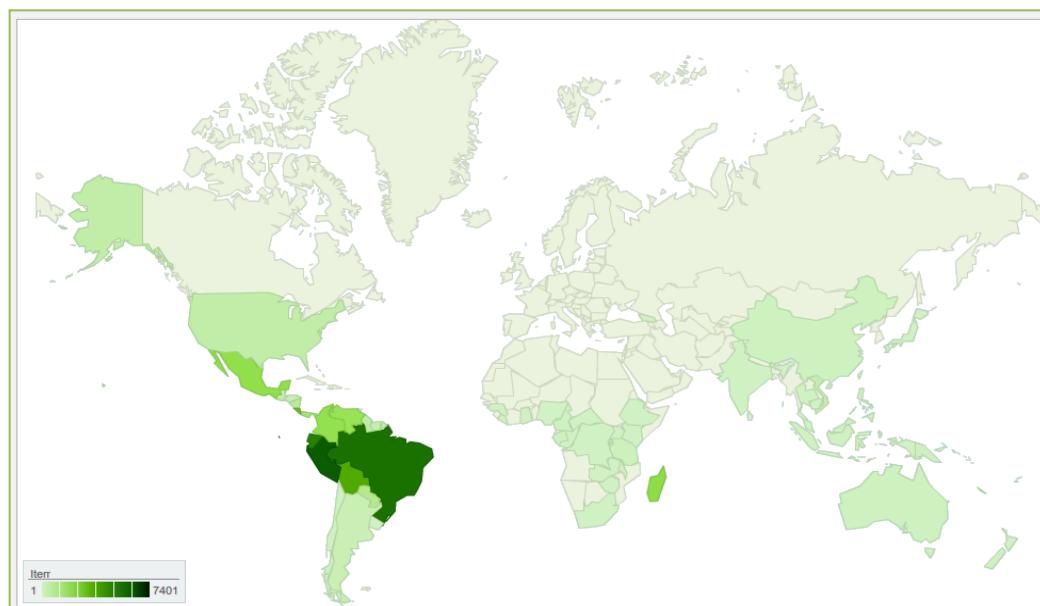
Ocotea duckei e langambina

I.1. A FAMÍLIA LAURACEAE

A denominação da família Lauraceae foi estabelecida por Jussieu em 1789 e o conhecimento e uso de suas espécies vem desde as antigas civilizações. Em documentos da China de 2800a.C., há relatos do emprego do óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e de outras espécies do gênero na medicina (JÚNIOR, 1984). As folhas de *Laurus nobilis* L., o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos conhecidos da culinária de todo o mundo. (GOTTLIEB, 1972).

As plantas da família Lauraceae apresentam-se distribuídas por todo o mundo (Figura 1, p. 29), sendo bem representadas nas zonas temperadas, especialmente nas matas centro e sul-americanas. Possui cerca de 52 gêneros e 3 mil espécies (GARCEZ et al., 2009). No Brasil, ocorrem aproximadamente 24 gêneros e 435 espécies, em geral arbóreas, encontradas em áreas de Florestas Pluviais, Restingas e Cerrado (BARROSO et al., 2002; QUINET et al., 2012).

Figura 1 – Distribuição da família Lauraceae no mundo



Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14 Jan 2012
Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000016>>

As espécies da família Lauraceae são consideradas uma das mais importantes economicamente dentre aquelas encontradas nas florestas equatoriais e tropicais em virtude da boa qualidade da madeira, podendo ser utilizada para a fabricação de papel (celulose), marcenaria (móvels), construção civil (pranchas de madeiras e escorás). Os óleos essenciais das espécies possuem alto valor comercial, podendo ser utilizados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de perfumarias e também na culinária, como condimentos e flavorizantes. Além disso, muitas espécies também são empregadas na medicina popular, pela utilização dos óleos essenciais e resinas, como, por exemplo, as pertencentes aos gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea* e *Licaria* (MARQUES, 2001; SILVA et al., 2009). Essa importância econômica que as Lauraceae apresentam e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal são, entretanto, fatores que colocam sob perigo de extinção a maior parte das suas espécies. A exploração econômica deve ser efetuada de maneira sustentável, como preconiza a Química Verde, a fim de não esgotar o potencial e contribuição das espécies da família Lauraceae para a sociedade (ARAÚJO, 1994).

I.2 O GÊNERO *OCTOEAE*

Ocotea Aublet é o maior gênero da família Lauraceae, contendo cerca de 350 espécies distribuídas principalmente na América tropical e subtropical, desde o sul da Flórida e México até a Argentina. No Brasil, estima-se que ocorrem cerca de 170 espécies, segundo levantamento recente (ROHWER, 1993; BAITELLO, 2001; QUINET et al., 2012a).

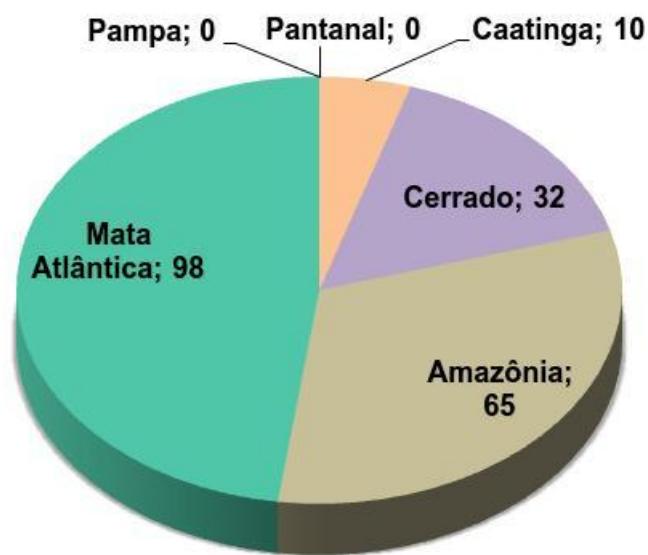
O gênero *Ocotea* caracteriza-se por sua variabilidade, servindo como depósito de espécies que não são prontamente classificadas em outros gêneros (WERFF, 1991). Segundo Rohwer (1993), é o gênero menos definido da família Lauraceae.

Em relação a suas características botânicas, apresenta flores trimeras bissexuadas, polígamias ou unisexuadas, 9 estames, estéreis nas flores pistiladas, anteras 4-loceladas (muito raramente 2-loceladas em poucas espécies da América Central), esporângios arranjados em dois pares sobrepostos ou raramente os locelos superiores entre os inferiores formando um arco fechado, filetes pouco mais

longos que as anteras ausentes, estames da terceira série com um par de glândulas na base dos filetes, glândulas em geral globosas ou reniformes, estaminódios da quarta série ausentes a conspícuos, nunca claramente sagitados. Nas suas flores estaminadas, possuem ovário bem desenvolvido a ausente e os frutos apresentam-se sobre cúpula de tamanho e forma variadas. (BAITELLO, 2001)

O gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros devido a sua ampla distribuição fitogeográfica no território nacional (Figura 2, p.31), e pelo fato de apresentar um grande número de espécies com propriedades medicinais (MARQUES, 2001; ZANIN et al., 2007).

Figura 2 – Distribuição das espécies de *Ocotea* por domínio fitogeográfico



Adaptado de: Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 19 Jan 2012 < Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008440>>

Segundo levantamento realizado do Natural Products Alert (NAPRALERT) em 2009, as espécies do gênero apresentam propriedades medicinais variadas como tônico e estomáquico (*O. aciphylla*), contra abcessos (*O. guianensis*), contra dores de cabeça e gastrintestinais (*O. bullata*), no tratamento de infecções de pele, úlceras e tumores (*O. caparrapi*), antihipertensivo (*O. foetens*), antimalárico (*O. usambarensis*), dentre outras.

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes espécies de *Ocotea*, visando o isolamento e a caracterização de seus metabólitos naturais.

Quimicamente, o gênero possui composição bastante variada, conhecida pela diversidade entre espécies e também entre classes de constituintes. Apresentam como principais classes de metabólitos os óleos essenciais, entre monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (LACERDA, 2004; PINO et al., 2005), alcalóides benzilisoquinolínicos e aporfínicos (VILEGAS et al., 1989; DIAS et al., 2003a), lignanas e neolignanas (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1989; SILVA et al., 1989). As plantas do gênero *Ocotea* são geralmente bastante aromáticas, com utilidades na indústria de perfumaria (GOTTLIEB, 1972; NARANJO et al., 1981) e também como flavorizantes (BRUNI et al., 2004).

I.3 A ESPÉCIE *OCOTEA DUCKEI* VATTIMO

Ocotea duckei Vattimo é uma planta de porte arbóreo (Figura 3, p.33), conhecida popularmente como “louro-de-cheiro”, “louro-pimenta” ou “louro-canela”, sendo encontrada no Nordeste brasileiro, em áreas de Mata Atlântica. Sua localização abrange os estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia (BARRETO, 1990).

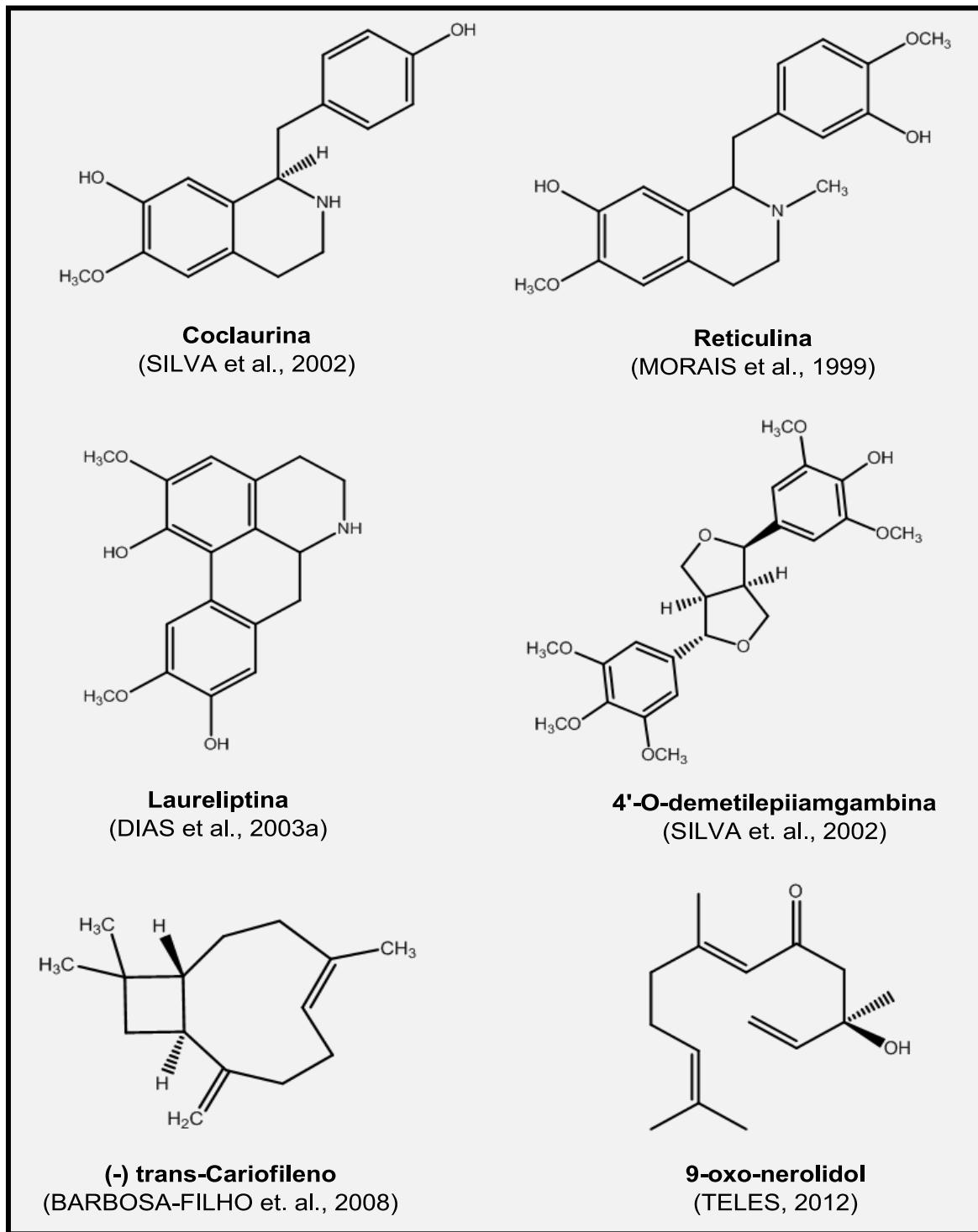
O uso popular de *Ocotea duckei* como planta medicinal não é relatado na literatura, entretanto, a espécie vem sendo estudada desde a década de 90, tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico, no antigo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Através de estudos coordenados pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho foram isolados uma grande variedade de produtos naturais, dentre eles, alcalóides (MORAIS et al., 1998; SILVA et al., 2002; DIAS et al., 2003), lignanas (MORAIS et al., 1996; MORAIS et al., 1998a; MORAIS et al., 1999; BARBOSA-FILHO et al., 1999), monoterpenos e sesquiterpenos (DIAS et al., 2003a; BARBOSA-FILHO et al., 2008). No Quadro 1, p.34, podem ser observadas as estruturas de algumas substâncias isoladas. As lignanas constituem os metabólitos majoritários em *O.duckei*, em especial a iangambina, a qual vem sendo estudada extensivamente quanto às suas propriedades farmacológicas, sendo considerada uma molécula promissora para o desenvolvimento fitoterápico / fitofármaco.

Figura 3 - A espécie *O.duckei*, com detalhe das folhas, inflorescências e tronco



Fotos: Sandro Leal, 2011

Quadro 1 - Alguns constituintes químicos isolados de *Ocotea duckei*.



I.4 LIGNÓIDES

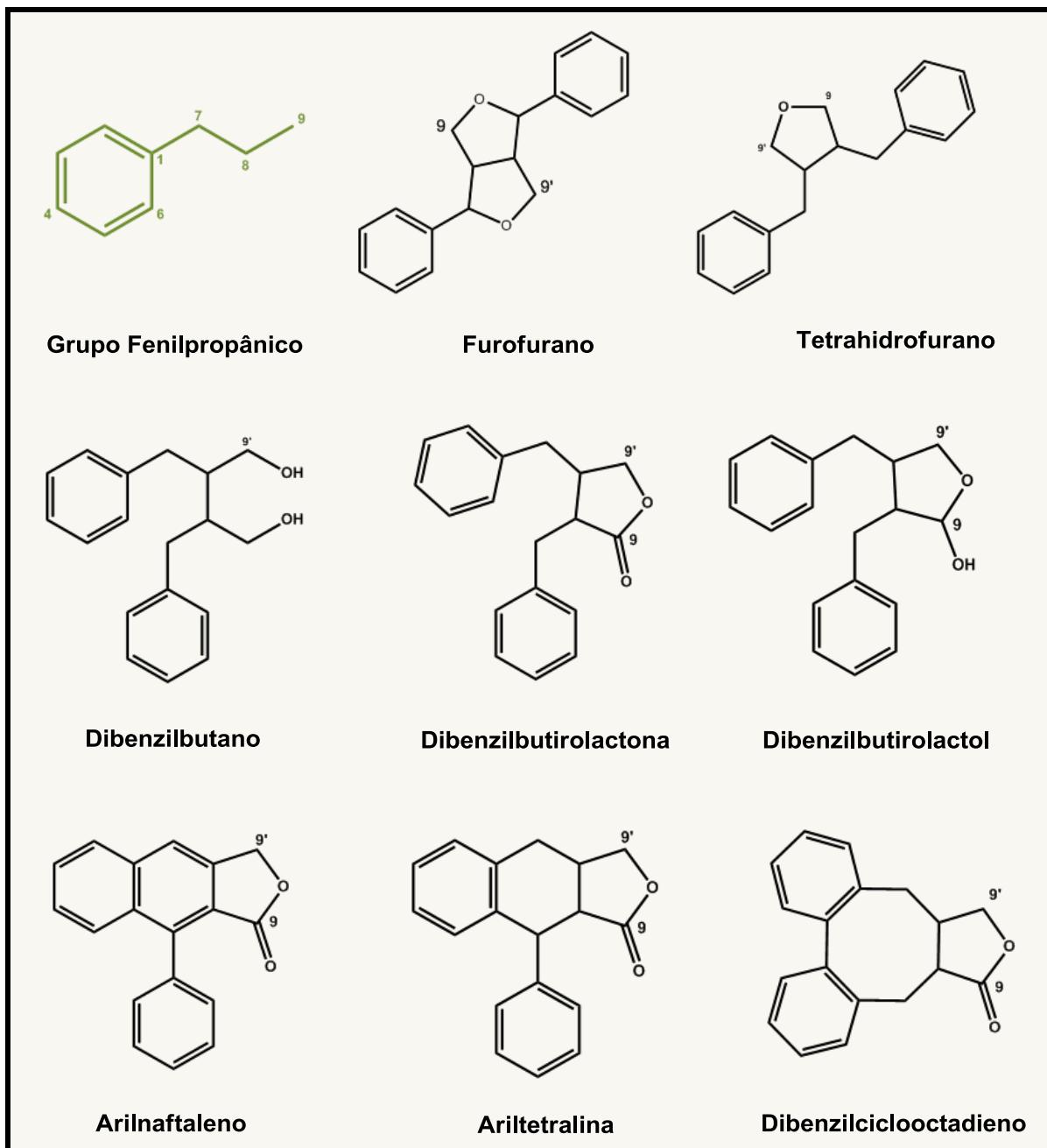
I.4.1 NOMENCLATURA, ESTRUTURA E PROPRIEDADES

Os lignóides são produtos naturais que possuem sua estrutura básica formada exclusivamente por grupos fenilpropânicos (do tipo C₆C₃), condensados em algumas unidades. (BARBOSA-FILHO, 2007). São classificados em lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides, de acordo com as variações biogenéticas que ocorrem no acoplamento oxidativo entre as unidades fenilpropânicas. Assim, segundo GOTTLIEB (1978), as lignanas são dímeros de ácidos cinâmicos e/ou alcoóis cinamílicos, apresentando o carbono 9 da cadeia lateral oxigenado; enquanto que as neolignanas incluem os dímeros de propenilfenóis e de alilfenóis, sem oxigenação em C-9. Atualmente, segundo a IUPAC (MOSS, 2000) as lignanas seriam os dímeros de unidades C₆C₃ ligadas pelos carbonos 8,8' de suas respectivas cadeias laterais. São consideradas neolignanas os dímeros unidos por outras posições diferentes das 8,8'.

As lignanas são classificadas nos seguintes subgrupos, baseadas na forma em que o oxigênio é incorporado no esqueleto principal e no padrão de ciclização: furofurano, furano, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, ariltetralina, aril-naftaleno, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (Quadro 2, p.36). As lignanas de cada subgrupo variam bastante nos níveis oxidativos dos anéis aromáticos bem como nas cadeias laterais. Assim, ainda podem ser classificadas em três categorias, dependendo do estado oxidativo das posições terminais C9(C9'): lignanas com oxigênio 9(9'), lignanas sem oxigênio 9(9') e lignanas de ácidos dicarboxílicos. (SUZUKI, 2007).

Em espécies de *Ocotea*, a ocorrência de fenilpropanóides é bastante freqüente, presentes nas frações voláteis obtidas dos troncos e folhas junto com mono e sesquiterpenos (FUNASAKI, 2006). A isso, pode-se justificar a presença igualmente freqüente de lignanas. Entretanto, a diversidade estrutural é bastante restrita, predominando os esqueletos furofurânicos (ex: Sesartemina), (BARBOSA-FILHO et al., 1999) e ariltetralina (ex: Lioniresinol) (GARCEZ et al., 2005).

Quadro 2 - Esqueletos estruturais básicos das lignanas (adaptado de SUZUKI, 2007)



Acredita-se que os lignóides estejam intimamente relacionados a um mecanismo sofisticado de defesa, desenvolvido durante a co-evolução das plantas e insetos (GARCIA & AZAMBUJA, 2004). Há evidências concretas que os lignóides atuam modificando processos fisiológicos específicos nos insetos, inibindo o crescimento das larvas, promovendo toxicidade, dentre outros (BOWERS et al., 1976; MIYAZAWA et al., 1994; SRIVASTAVA et al., 2001; CABRAL et al., 2007). Alguns lignóides apresentam importantes atividades biológicas como é o caso da

podofilotoxina, que apresenta atividade antitumoral. Através de estudos de modificação molecular, visando otimizar sua atividade, solubilidade e diminuir a toxicidade, desenvolveu-se os derivados semi-sintéticos tenoposídeo e etoposídeo, utilizados na terapia do câncer (SRIVASTAVA et al., 2005). A inibição do fator de agregação plaquetária (PAF) é uma importante atividade biológica relatada para lignóides, sendo observado com a kadsurenona (SHEN et al., 1985); uma série de lignanas de *Magnolia biondii* (PAN et al., 1987); a iangambina e o siringaresinol, isolados de *Ocotea duckei* (CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995a; CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995b), a schisandrina A, isolada dos frutos de *Schisandra chinensis* (JUNG et al., 1997) além de neolignanas isoladas de *Ocotea macrophylla* (COY-BARRERA, 2009).

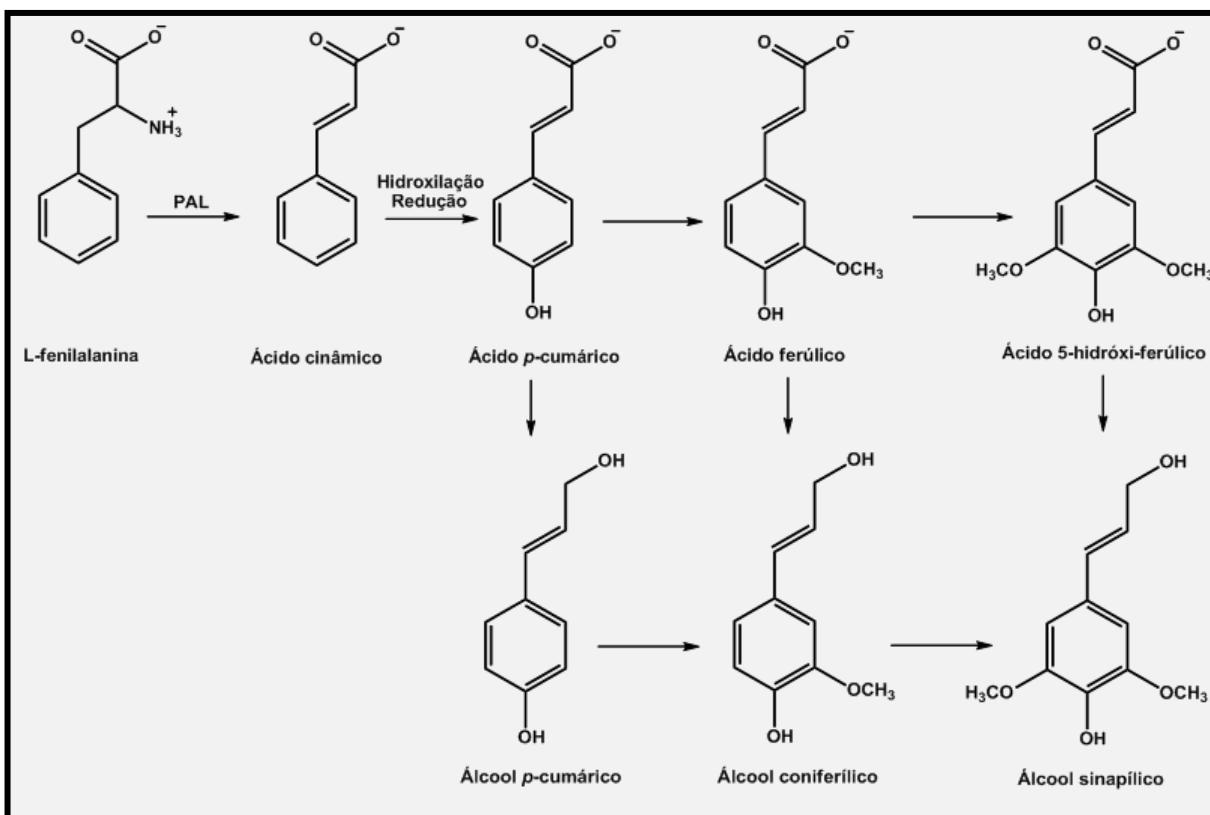
A sibilenona, isolada de *O. bullata* apresentou alta atividade antiinflamatória com efeito inibitório da 5-lipoxigenase (ZSCHOCKE et al., 2000). Coy-Barrera (2011) também relata excelentes propriedades antiinflamatórias *in vitro* com as lignanas furofurânicas isoladas de *O. macrophylla*, o mesmo observado por Kim et al. (2009) com as lignanas de *Magnolia fargesii*.

Além disso, estudos recentes mostraram excelentes propriedades de novas lignanas sobre a inibição do vírus da Hepatite B (WEI et al., 2011; LI, L. Q. et. al., 2012); atividade antimalárica de lignanas furofurânicas (ORTET et al., 2011); neolignanas com ação parasiticida (CABRAL et. al., 2010); propriedades de indução da apoptose (MANSOOR et al., 2012); ação antihipertensiva (LI, L. et al., 2012). Pode-se destacar ainda as atividades: antioxidante (CHIN et al., 2008), inibição enzimática (LEE et al., 2009) e atividade anti-HIV (XIAO et al., 2010).

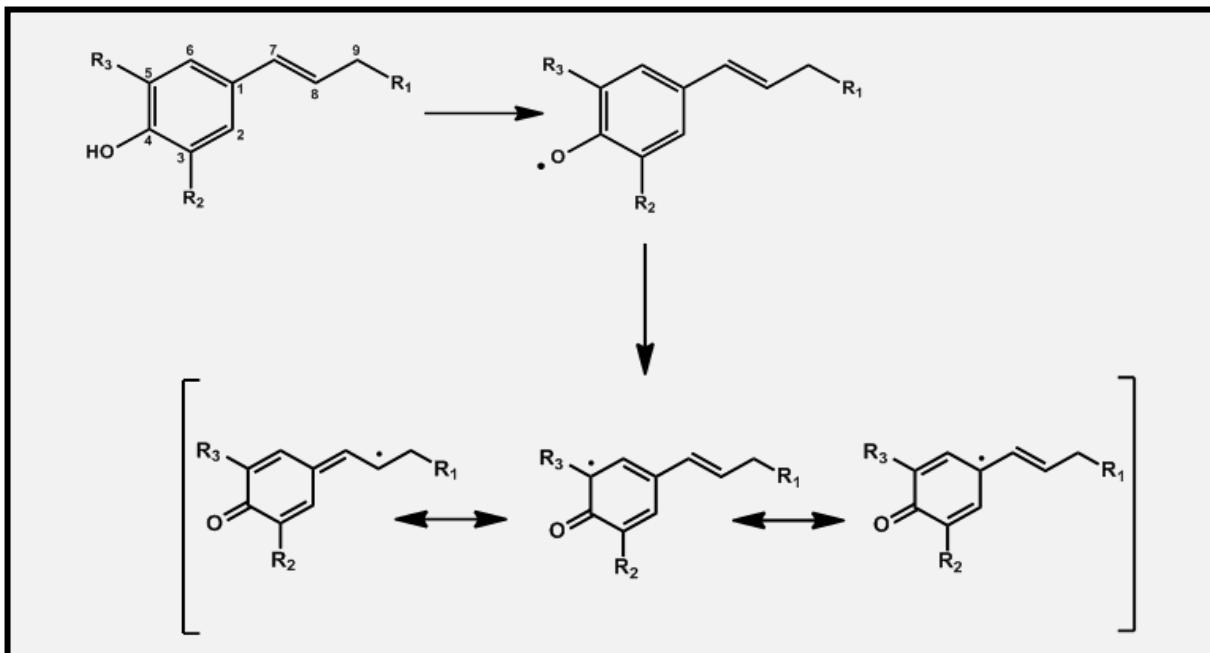
Os trabalhos de MacRae e Towers (1984); Ayres e Loike, (1990) relatam mais atividades farmacológicas relativas aos lignóides. Também vale salientar o trabalho de revisão sobre as propriedades químicas e biológicas das lignanas, realizado por Ríos (2002). Dessa forma, evidencia-se o importante papel dos lignóides como produtos naturais capazes de apresentar um potencial farmacológico variado, reflexo da imensa diversidade química que possuem.

I.4.2 ASPECTOS BIOSSINTÉTICOS

A grande diversidade química dos lignóides pode ser explicada pela sua rota biossintética (Figura 4, p. 39), originados por unidades de fenilpropanóides. Estes são biossintetizados a partir do aminoácido L-fenilalanina. A primeira etapa da via fenilpropanoídica é a desaminação deste aminoácido pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), sendo convertido ao ácido cinâmico que, após uma reação de hidroxilação e redução, produz o álcool *p*-cumárico (DIXON et al., 2001; FUNASAKI, 2006). Após uma série de etapas, incluindo outra etapa de hidroxilação do anel aromático, metilação, formação do tioéster de coenzima A (CoA) e redução, resultam as unidades propenil ou alilfenóis. Por fim, as dimerizações de fenilpropanóides oxidados no C9 (ácidos e alcoóis) produzem as lignanas através de acoplamento oxidativo por enzimas específicas (FUNASAKI, 2006). A variedade estrutural dos lignóides para formação de lignanas, neolignanas e análogos resulta desses acoplamentos, que são iniciados com a formação do radical livre fenóxido, o qual pode formar estruturas de ressonância (Figura 5, p. 39) com o radical livre localizado nas posições 1, 3, 5 e 8. Dessa forma, as combinações dos vários radicais através das posições 8-8', 8-1', 8-5' e 8-O-4' entre outras resultam em uma grande variedade estrutural (BARBOSA-FILHO, 2007; FUNASAKI, 2006).

Figura 4 - Rota biosintética para a formação dos precursores das lignanas

(adaptado de FUNASAKI, 2006; SUZUKI & UMEZAWA, 2007)

Figura 5 - Estruturas de ressonância dos radicais fenilpropanoídicos

Adaptado de (FUNASAKI, 2006)

A via biossintética das lignanas furofurânicas por adições nucleofílicas estereoseletivas foi investigada em experimentos com espécies do gênero *Forsythia* (RÍOS, 2002). Foi demonstrado que duas moléculas não quirais do álcool coniferílico sofrem acoplamento estereoseletivo fornecendo (+)-pinoresinol, o qual é submetido a uma redução dependente de NADPH altamente enantioespecífica para a formação do (+)-lariciresinol. Em seguida há a formação do (-)-secoisolariciresinol, precursor do (-)(-)-matairesinol, o qual, após uma série de reações subseqüentes, origina a podofilotoxina (DAVIN et al., 1992; KATAYAMA et al., 1993)

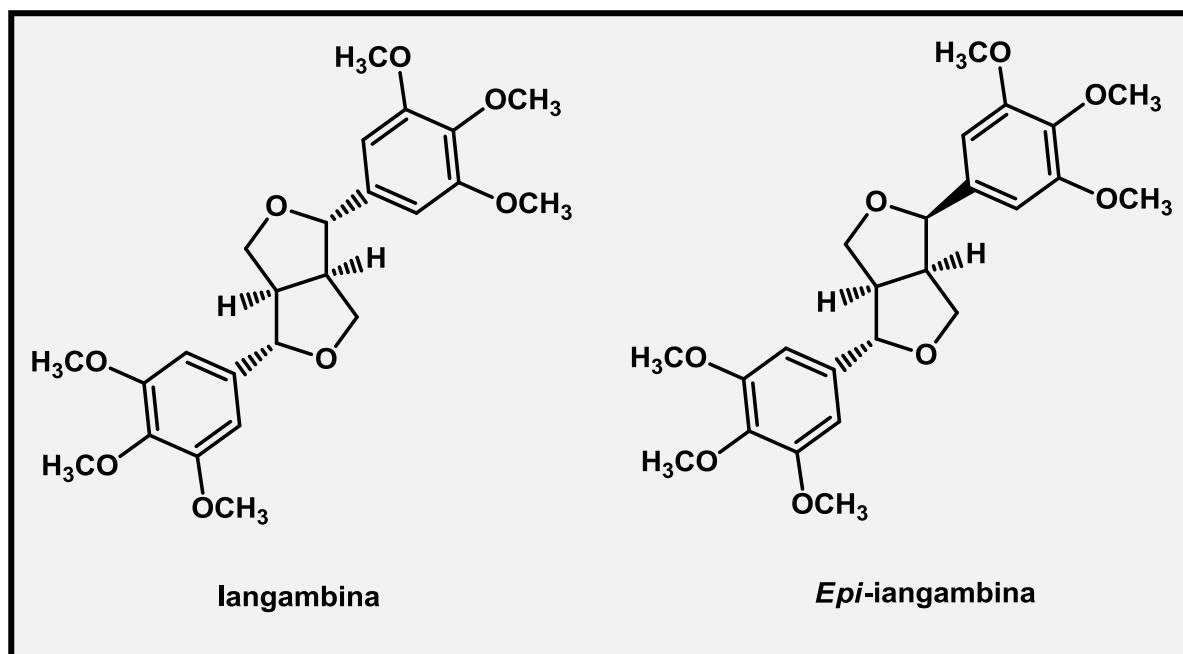
Os mecanismos para o controle estritamente enantioseletivo do acoplamento oxidativo estão relacionados a proteínas dirigentes (SUZUKI & UMEZAWA, 2007). O primeiro exemplo desse tipo de proteína foi a (+)-pinoresinol sintase, obtida a partir dos resíduos da parede celular de *Forsythia intermedia* (DAVIN et al., 1997). Desde então, uma série de estudos vêm sendo realizados baseados nas proteínas dirigentes, dentre elas, a pinoresinol/lariciresinol reductase (SUZUKI et al., 2002) e a secoisolariciresinol deidrogenase (XIA, 2001), a fim de obter um maior entendimento sobre os mecanismos quirais da biossíntese das lignanas e sua aplicação na química biomimética.

Na natureza, as lignanas ocorrem exclusivamente como um enantiômero ou como misturas enantioméricas com proporções variadas (UMEZAWA, 2003). Segundo análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna quiral, não há evidências que lignanas furofurânicas sejam oticamente puras (>99%), ou seja, existem como uma mistura de enantiômeros (UMEZAWA, 1997). Por outro lado, as lignanas do tipo dibenzilbutirolactona são oticamente puras, o que evidencia o papel fundamental das proteínas dirigentes para a definição espacial da molécula.

I.5 IANGAMBINA

A iangambina é uma lignana do tipo furofurâncica (Figura 6, p. 41), isolada como lignóide majoritário de *Ocotea duckei* (MORAIS, 1999). Estima-se que tenha sido isolada de cerca de 20 espécies de plantas em diferentes partes do mundo. No Brasil, os trabalhos com *Virola elongata* Bark já reportavam seu isolamento, há cerca de 30 anos (MACRAE e TOWERS, 1985). Também há relatos de seu isolamento de plantas da família Annonaceae, em espécies do gênero *Rollinia* e *Annona* (MESQUITA et al., 1988; CHEN et al., 1996; DUTRA et al., 2012); espécies de Magnoliaceae (FIGUEIREDO et al., 1999; SEO et al., 2008) bem como de outras espécies de *Ocotea* (CUCA et al., 2009). As fontes utilizadas para extração e purificação do composto são diversas, incluindo folhas, caule, casca do caule, frutos e raiz (TIBIRIÇÁ, 2001).

Figura 6 - langambina e seu epímero, *epi*-iangambina



Os estudos com a iangambina no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PGPNSB/UFPB) surgiram no início da década de 90, sendo investigada extensivamente quanto à suas propriedades farmacológicas. As atividades descritas para a iangambina estão resumidas na Tabela 1, p.44.

Os primeiros estudos foram relatados por Pachú et al. (1993), através do estudo de toxicidade aguda, em que se verificou as doses tóxicas da iangambina para proceder com a determinação da dose letal 50 % (DL50). Foi observado que não ocorreu efeito letal da iangambina após o tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos, até a dose de 1 g/kg e 48 horas após tratamento. Os estudos farmacológicos sugeriram que a iangambina possui atividade depressora do sistema nervoso central, podendo atuar como anticonvulsivante e hipnótico-sedativo.

Em 1995, foi avaliada a possível ação analgésica da iangambina, que mostrou um efeito inibitório significativo do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, um teste que envolve estímulo químico. A iangambina não apresentou efeitos significativos nos testes por estímulo térmico, entretanto, não elevou o tempo de reação à dor, o que indicaria uma provável ação antinociceptiva de natureza periférica (ALMEIDA et al., 1995).

A atividade de inibidor seletivo do fator de agregação plaquetária (PAF) foi demonstrada por Castro-Faria-Neto et al. (1995a e 1995b). Baixas doses de PAF administradas sistematicamente em coelhos induziram um dano, reversível, da função cardiovascular e alterações hematológicas, caracterizadas pela redução dose-dependente da pressão arterial, leucopenia e trombocitopenia. A administração de iangambina provocou desvio paralelo para direita na curva dose-resposta da hipotensão arterial induzida pelo PAF, sem reduzir a resposta máxima, sugerindo a existência de antagonismo competitivo com o PAF. Esses estudos também mostraram que a iangambina é um antagonista seletivo aos efeitos hipotensores induzidos pelo PAF nas ações cardiovasculares, já que não bloqueou os efeitos de outros mediadores vasoativos como acetilcolina, histamina e serotonina. Além disso, mostrou seletividade em bloquear a trombocitopenia induzida pelo PAF, no entanto a leucopenia permaneceu inalterada.

A iangambina inibe a agregação plaquetária induzida pelo PAF, entretanto, falhou em inibir a agregação induzida pelo colágeno, ADP ou trombina, mostrando que a lignana é um antagonista específico dos efeitos do PAF nas plaquetas. A

quimiotaxia dos neutrófilos induzida pelo PAF não foi inibida, sugerindo-se que pode haver diferenças entre os receptores expressos nas plaquetas e nos neutrófilos (CASTRO-FARIAS-NETO et al., 1995b). Em estudos realizados por Herbert et. al. (1997) e Jesus-Morais et al. (2000), ficou evidenciado que a iangambina é capaz de discriminar entre esses diferentes subtipos de receptores de PAF presentes nas plaquetas e neutrófilos, o que possibilitou um melhor entendimento sobre os mecanismos patológicos envolvendo o PAF, doenças inflamatórias e alterações cardiovasculares.

Estudos em modelo de choque anafilático em ratos anestesiados mostraram que a iangambina é um antagonista do PAF de origem natural que protege os animais da morte e alivia o colapso cardiovascular causado pelo choque anafilático, melhorando respostas à catecolaminas. Esses achados caracterizam o PAF como um mediador letal nas reações de hipersensibilidade (TIBIRIÇÁ et al.; 1996; RIBEIRO et al., 1996; TIBIRIÇÁ, 2001).

Neste sentido, Serra et al. (1997) avaliaram o potencial da iangambina quanto às suas propriedades anti-alérgicas, em testes de hipersensibilidade imediata, como droga anti-anafilática. Observou-se que a iangambina exibe propriedade antagonista não somente sobre os receptores do PAF, mas também sobre outros receptores associados aos processos alérgicos, podendo ser uma importante ferramenta na conduta de algumas doenças.

Adicionalmente, em teste de Ames, a iangambina não apresentou mutagenicidade (MARQUES et al., 2003), e também apresenta baixa toxicidade, segundo Monte-Neto et.al. (2008). Estes dados dão indícios de que a utilização terapêutica da iangambina pode não apresentar sérios efeitos colaterais.

A atividade sobre o Sistema Nervoso Central foi demonstrada por Sousa et al. (2005) e Lima (2005). O efeito sobre a mobilização de cálcio em neutrófilos foi observado por Chao et al. (2002). Foi demonstrado que a iangambina também possui efeito de indução da apoptose em células de tumor colo-rectal, conforme estudado por Hausott (2003). Apresentou ainda atividade antiinflamatória, como inibidor da produção de óxido nítrico (inibição da enzima iNOS) em microglia ativada por lipopolissacarídeo (LPS) (KIM et al., 2009).

Outras atividades biológicas relacionadas à iangambina incluem: inibição do desenvolvimento pós-embrionário e redução da oviposição na espécie de mosca *Chrysomya megacephala* (CABRAL et al., 2007); atividade anti-leishmania, contra

formas promastigotas de *L. chagasi* and *L. amazonensis* (MONTE-NETO et al., 2007;).

Tabela 1 - Atividades biológicas da iangambina

Atividade biológica	Referência
Atividade depressora do SNC, anticonvulsivante, antihipnótico	PACHÚ et al., 1993 SOUSA et al., 2005 LIMA, 2005
Antagonista específico do fator de agregação plaquetária (PAF)	CASTRO FARIA NETO et al., 1995 CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995b HERBERT et al., 1997 JESUS-MORAIS et al., 2000
Atividade analgésica	ALMEIDA et al., 1995
Propriedades anti-alérgicas	SERRA et al., 1997
Propriedades cardiovasculares	TIBIRIÇÁ et al., 1996 RIBEIRO et al., 1996 TIBIRIÇÁ, 2001
Baixa toxicidade, não-mutagenicidade	MARQUES et al., 2003 MONTE-NETO et.al., 2008
Efeito sobre a mobilização de cálcio em neutrófilos	CHAO et al., 2002
Indutor da apoptose em células tumorais	HAUSOTT et al., 2003
Atividade antiparasitária (anti-leishmania)	MONTE-NETO et. al., 2007 MONTE-NETO et al., 2011
Atividade antiinflamatória	KIM et al., 2009

Assim, todas estas propriedades farmacológicas, aliadas com uma relativa facilidade de isolamento fazem da iangambina uma molécula promissora na prospecção de um novo fármaco. É importante salientar que a maioria dos testes farmacológicos anteriormente citados foram realizados com a iangambina isolada como precipitado, segundo a marcha de isolamento para lignóides (BARBOSA-FILHO et al., 1999). Após análise de RMN, a iangambina apresentava-se na forma de uma mistura de isômeros, com uma certa proporção de seu epímero, epi-

iangambina, evidenciando as características biossintéticas das lignanas furofurânicas, conforme abordado anteriormente. Não há relatos na literatura sobre as implicações farmacológicas em que a mistura epimérica contribuiria para o efeito total apresentado bem como não há estudos que avaliam os efeitos isolados da iangambina e epi-iangambina. Na farmacologia, a estereosseletividade é um importante fator na eficácia de uma droga. De fato, cerca de 56% dos fármacos utilizados possuem estruturas quirais. Em adição, aproximadamente 88% destes fármacos sintéticos quirais são usados terapeuticamente na forma de racematos. Contudo, em muitos destes fármacos não há estudos de estereo especificidade do metabolismo e/ou dos efeitos farmacodinâmicos de seus enantiômeros (RENTSCH, 2002).

Dessa forma, de modo a tornar a iangambina em um protótipo de fármaco promissor e incorporá-la em uma forma farmacêutica adequada, faz-se necessário obter um melhor conhecimento sobre suas características físico-químicas, além de garantir uma pureza adequada para avaliar suas propriedades farmacológicas específicas.

Capítulo II

Síntese da langambina

II. 1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas possuem um importante papel para a descoberta de novas drogas. Estes produtos naturais evoluíram ao longo do tempo para interagir com diversos alvos biológicos e representam um dos mais importantes agentes farmacêuticos no tratamento de doenças (LI & VEDERAS, 2009).

Entretanto, devido ao surgimento de novas doenças e aumento da resistência ao tratamento, novos agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação são necessários. As modificações por hemi-síntese de produtos naturais, visando melhorar suas propriedades biológicas, ou a síntese total de análogos, servem como estratégias iniciais para originar estes agentes (CARTER, 2011; WINTER & TANG, 2012).

A síntese química de produtos naturais é possível e economicamente viável, especialmente para aqueles com estruturas químicas relativamente simples, tais como a aspirina e a efedrina (KOLEWE et al., 2008). A metodologia utilizada na síntese de fármacos precisa ser capaz de viabilizar o acesso, com maior rendimento químico possível e na escala adequada de menor custo, a substâncias farmacoterapeuticamente ativas, de elevado grau de pureza, passíveis de serem empregadas com segurança na posologia prescrita como medicamentos (BARREIRO, 1991).

A busca por análogos estruturais e semi-síntese são as principais estratégias como forma de melhorar as propriedades farmacológicas do produto original (SUNAZUKA et al., 2008). Estima-se que dos 847 fármacos de baixo peso molecular lançados entre 1981 e 2006, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por semi-síntese e 572 obtidos por síntese total. Entretanto, 262 entre estas últimas substâncias poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (SCHMIDT et al., 2008; GILBERT, 2008). No período de 2005 a 2010, um total de 19 drogas derivadas de produtos naturais foram aprovadas para comercialização pelo FDA, dentre as quais 7 são classificadas como produtos naturais, 10 originadas por semi-síntese e 2 derivadas de produtos naturais (MISHRA & TIWARI, 2011).

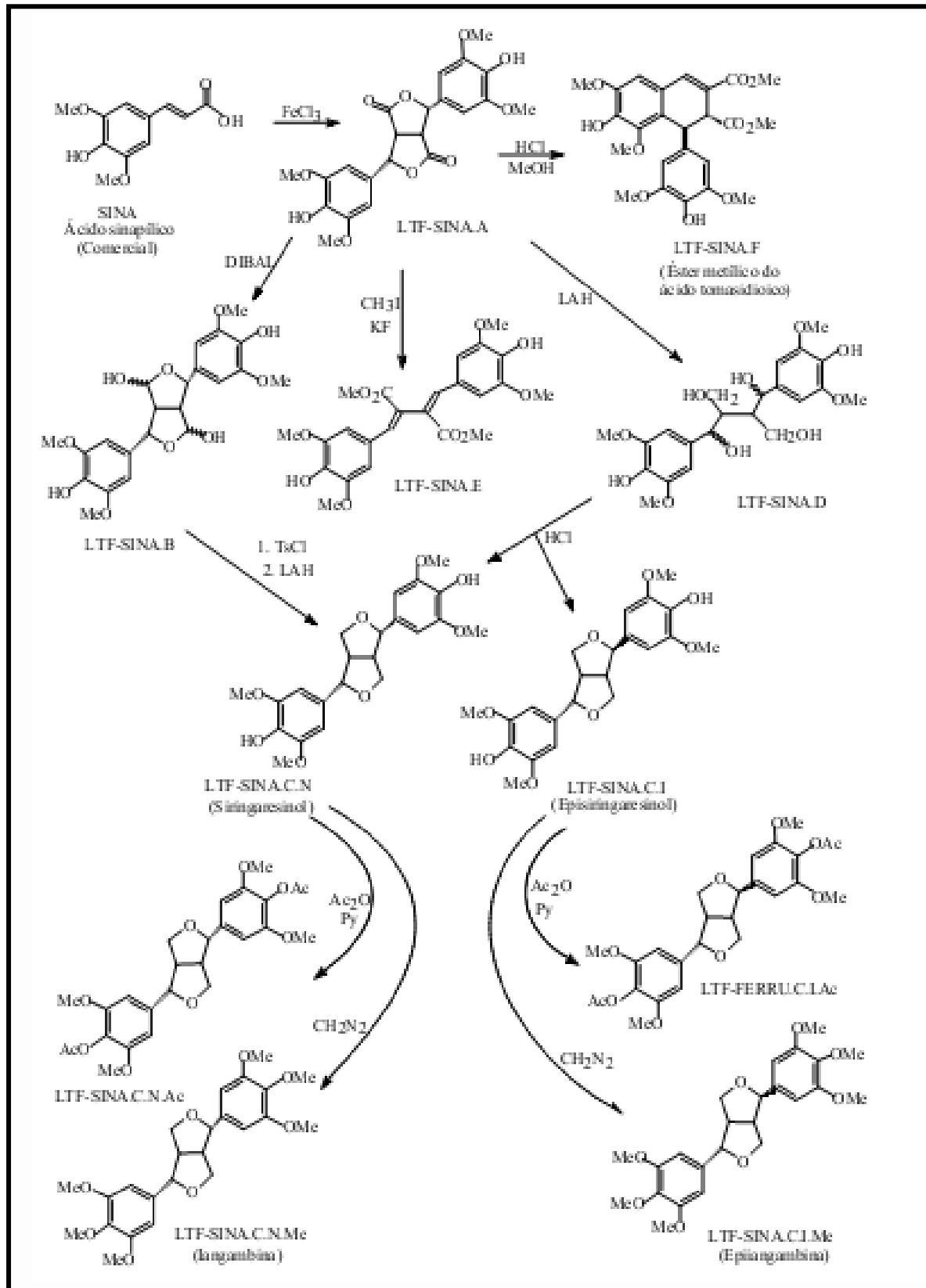
A síntese de lignanas vem atraindo o interesse da química bioorgânica, devido suas propriedades estereoquímicas. Numerosos tipos de síntese de lignanas

racêmicas são relatados na literatura especializada, contudo, poucos exemplos de síntese assimétrica dessas substâncias são encontrados e, mesmo assim, feitas por procedimentos complexos ou trabalhosos (PELTER et al., 1993; MASUNARI et al., 2001; WARD, 2003; KIM et al., 2006; BRONZE-UHLE, 2007).

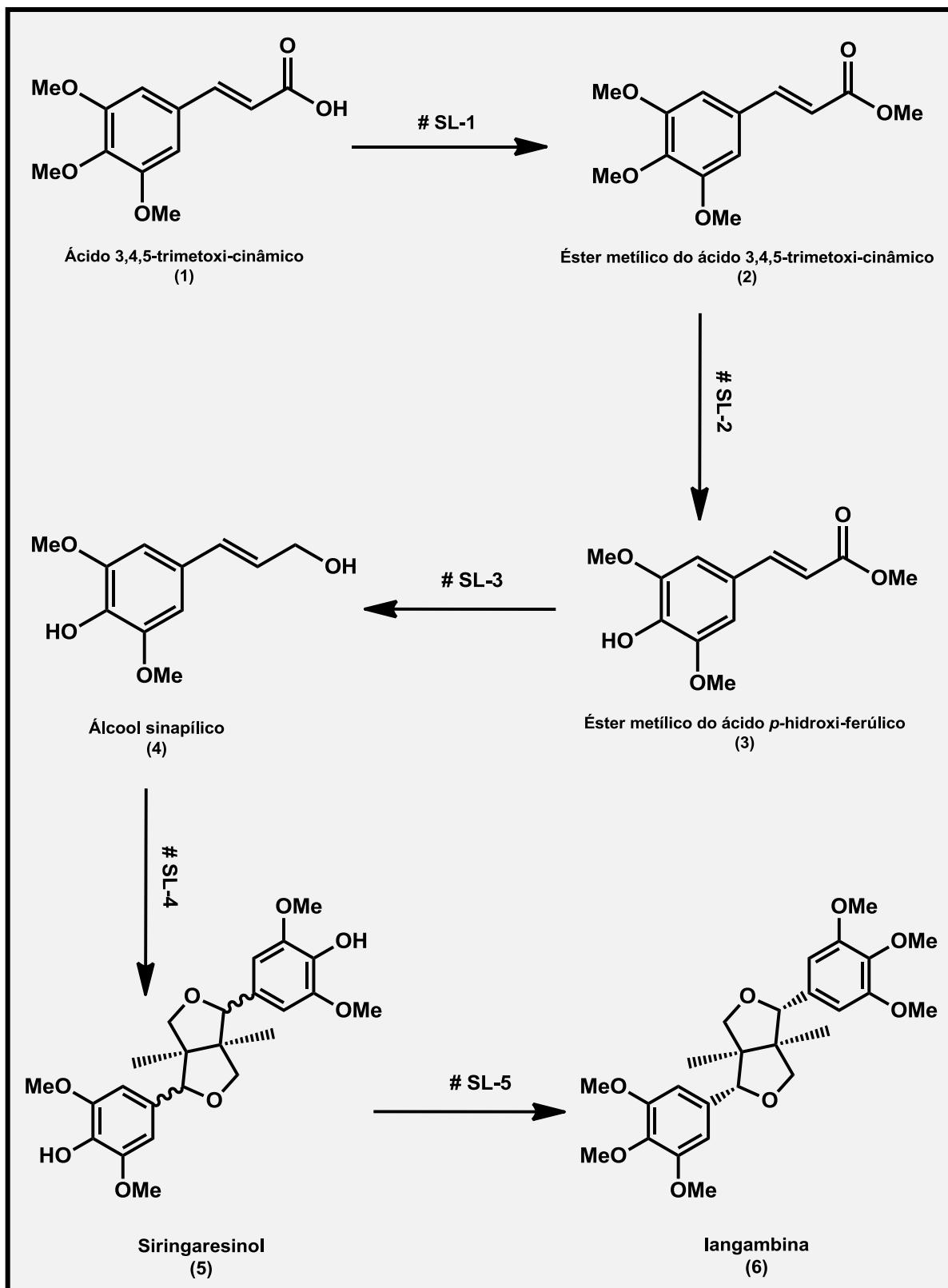
A primeira síntese total da iangambina é relatada por Suginome et al. (1995), em um método envolvendo a β -cisão de radicais alcóxi gerados por fotólise como passo principal. Uma outra rota sintética linear simplificada para síntese de lignanas furofurânicas foi relatada por Mori et al. (2006), na qual se obtém a iangambina e caruilignana A em formas oticamente puras. Além disso, a síntese dos sauriols A e B foi realizada pelos mesmos autores, seguindo-se a mesma rota sintética anterior (MORI et al., 2006a; PAN et al., 2009). Outros estudos realizados por Jung et. al (2006) e Kim et al. (2006) também relatam a síntese total estereoseletiva das lignanas eudesmina, iangambina e sesamina, através de condensação aldólica dianiônica, um método útil em originar o esqueleto básico das lignanas furofurânicas. Uma proposta de síntese foi apresentada pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho no projeto “Estudos visando a síntese da iangambina e de homólogos e análogos potencialmente ativos”, utilizando-se a dilactona como intermediário principal para a formação dos esqueletos furofurânicos básicos (Esquema 1, p. 49), entretanto, não houve êxito na continuação do projeto.

De modo a obter a iangambina em quantidades suficientes e em pureza adequada para realizar os procedimentos de validação, foi proposto testar uma nova rota sintética, simples e rápida, para sua obtenção, bem como de lignanas análogas, as quais serviriam como base para realização de estudos de relação estrutura-atividade biológica (SAR). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luís Cesar Rodrigues (CBiotec/UFPB). Um esquema geral da síntese desenvolvida/planejada durante o projeto está demonstrado no Esquema 2, p.50.

Esquema 1 - Proposta de síntese das lignanas furofurânicas segundo Barbosa-Filho et al. (PRONEX 97)



Esquema 2 – Rota sintética desenvolvida durante o projeto para a síntese da iangambina.



II.2 PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1 ESPECIFICAÇÃO DE MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da parte experimental, foram utilizados reagentes e solventes de grau para análise (P.A) ou grau HPLC, de fornecedores diversos (Sigma-Aldrich®, Merck®, Vetec®). Para obtenção dos solventes anidros utilizou-se aparelhagem de refluxo e destilação simples. As soluções de reagentes foram preparadas para utilização de acordo com a necessidade do experimento. As vidrarias utilizadas foram secas sob vácuo e atmosfera de nitrogênio antes do uso.

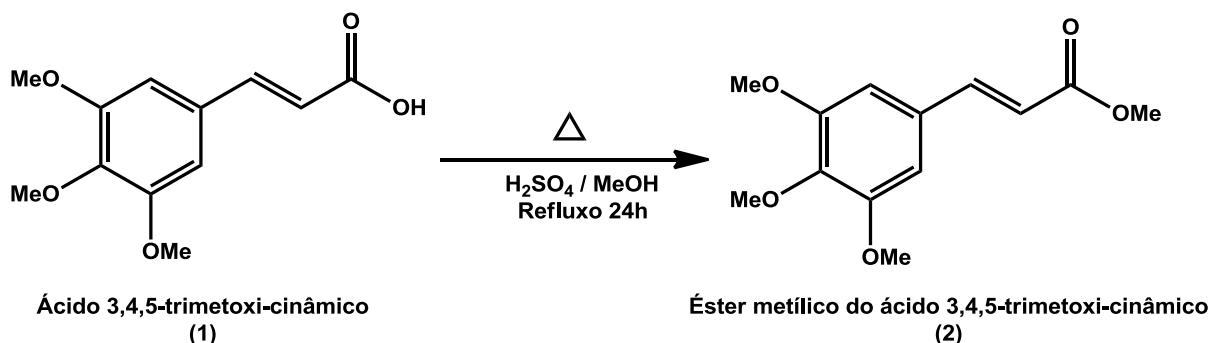
As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas utilizando-se cromatoplacas de alumínio de sílica-gel 60 da Merck®. As placas foram visualizadas utilizando luz ultravioleta (UV 254 e 366nm) e reveladas com solução de ácido fosfomolibídico, seguido de aquecimento. As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica-gel ART 7734 da Merck® (0,063 – 0,200mm e 70-230 mesh), com eluição sob média pressão.

Para concentração das soluções orgânicas foram utilizados rotaevaporadores do tipo Buchler e Büchi.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espetrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM, operando a 500 MHz e 125 MHz, localizado no laboratório multiusuário de caracterização e análise (LMCA/NUCAL/UFPB). As amostras analisadas foram preparadas por dissolução em clorofórmio deuterado (CDCl_3), da marca *Cambridge Isotope Laboratories*.

Os pontos de fusão das substâncias foram obtidos através de aparelho digital da Microquímica Equipamentos LTDA, modelo MQAPF-302, com temperaturas variando de 0-350 °C.

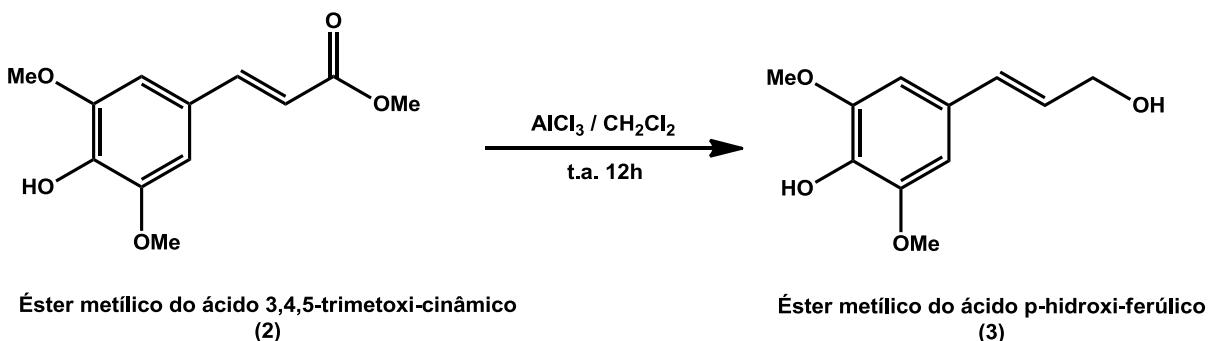
II.2.2 PREPARAÇÃO DO ÉSTER DO ÁCIDO 3,4,5-TRIMETOXI-CINÂMICO (#SL-1)



Em um balão de fundo chato de 30mL, pesou-se 1,0 g (4,2 mmol) do **ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (1)**, adicionando-se em seguida metanol (MeOH) em excesso (18 mL) até dissolução. Adicionou-se duas gotas de H_2SO_4 concentrado, sendo a mistura submetida a refluxo por cerca de 18 h. Após o período, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido, dissolvido em CH_2Cl_2 (40 mL). A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de $NaHCO_3$ (2x15 mL) em ampola de separação, seca com $MgSO_4$ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. A purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna (CC) em sílica-gel, sob eluição com a fase móvel Hex:AcOEt (7:3), obtendo-se o **éster metílico do ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (2)**. A reação foi monitorada por CCDA, aplicando-se o reagente (1) e o produto (2) para verificar seus fatores de retenção.

Rendimento: 98,97%, sólido amorfo branco

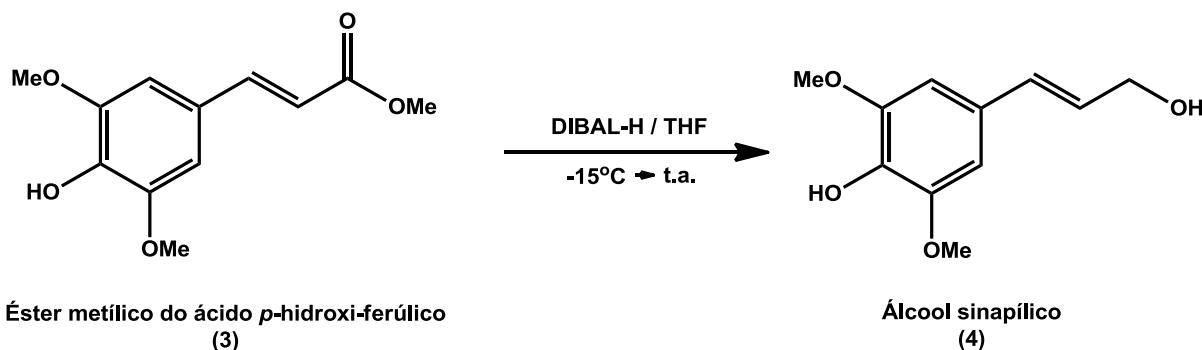
II.2.3 PREPARAÇÃO DO ÉSTER DO ÁCIDO P-HIDROXI-FERÚLICO (#SL-2)



Para o experimento, utilizou-se aparelhagem sob atmosfera de nitrogênio e vácuo. Previamente, preparou-se também o solvente CH_2Cl_2 seco. Em um balão de fundo redondo (sob vácuo e N_2) colocou-se rapidamente cerca de 1,11g de AlCl_3 (8,3 mmol, 2 eq.g). Com auxílio de uma seringa, coletou-se 18mL do CH_2Cl_2 seco e injetou-se no balão contendo o AlCl_3 . Paralelamente, em outro balão colocou-se 0,96g do **éster do ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (2)** (4,15 mmol, 1 eq.g), adicionando-se certa quantidade de CH_2Cl_2 até dissolução. Esta solução reagente foi coletada por seringa e injetada no outro balão contendo o AlCl_3 , sendo a temperatura controlada por banho de gelo. Submeteu-se a agitação magnética por 12h à temperatura ambiente. Após esse período, cessou-se a reação por adição de 10mL de H_2O . Em ampola de separação, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa, extraída com 2x15mL de CH_2Cl_2 . As fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de NaCl , secas com MgSO_4 anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Obteve-se um óleo viscoso amarelado, insolúvel em CH_2Cl_2 . Para purificação do produto, realizou-se cromatografia em coluna sob pressão, utilizando-se sílica-gel como adsorvente. Como sistema de eluição utilizou-se misturas em diferentes proporções de Hex: AcOEt, em grau crescente de polaridade, obtendo-se 29 frações, as quais foram analisadas por CCDA e separadas de acordo com seus Rf. As frações 7-29 mostraram conter o produto, **éster metílico do ácido p-hidróxi-ferúlico (3)**, que apresentou-se na forma de um pó amorfo, branco-amarelado.

Rendimento: 87%

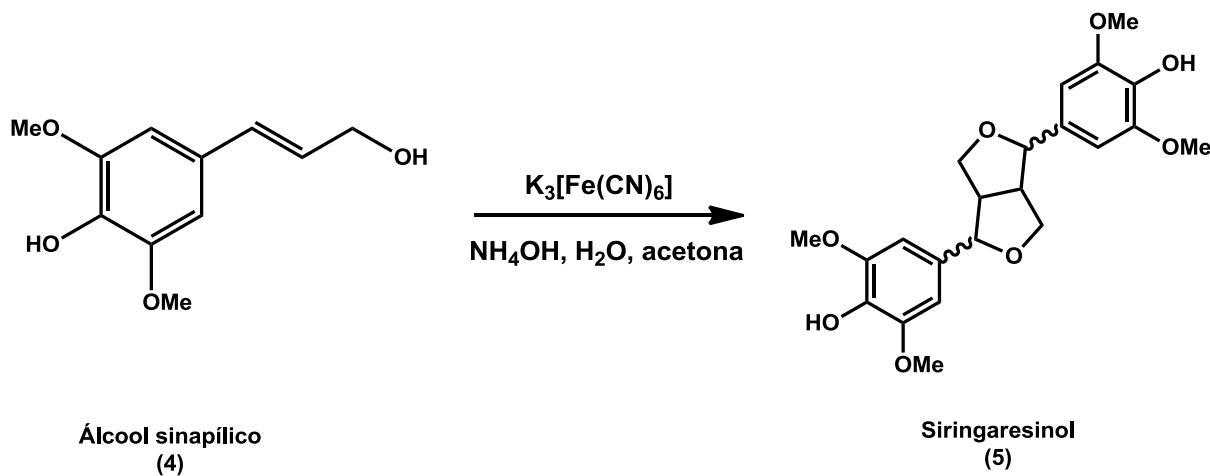
II.2.4 PREPARAÇÃO DO ÁLCOOL SINAPÍLICO (#SL-3)



Previamente, preparou-se um sistema de destilação para obtenção do tetrahidrofurano (THF) seco. O **éster do ácido *p*-hidroxi-ferúlico (3)** (3,31 mmol, 1 eq.g) obtido anteriormente foi colocado em um balão de 50mL (vácuo, N₂), adicionando-se 5 mL de THF por meio de uma seringa para dissolução. O balão foi submetido à agitação magnética, com controle da temperatura de reação por meio de um banho de gelo + NaCl (-5°C). Assim, adicionou-se, gota-a-gota, 7 mL do hidreto de diisobutil-alumínio (DIBAL-H) e, após certo tempo, mais 3 mL, totalizando 10 mL (10 mmol, 3 eq.g). Após cerca de 1h, a reação foi submetida à temperatura ambiente e cessada pela adição de 20 mL de H₂O. A fase orgânica obtida foi tratada com uma solução de HCl diluído a 1%, em seguida, com solução de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. A fase foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Obteve-se um óleo incolor contendo o **álcool sinapílico (4)**.

Rendimento: 66,77%

II.2.5 PREPARAÇÃO DO SIRINGARESINOL (#SL-4)



Preparou-se 15mL de uma solução do **álcool sinapílico (4)** (0,340mg, 1,62 mmol, 1 eq.g.) em sistema acetona:H₂O (2:1). A esta solução, adicionou-se 5mL de uma solução 3M de NaHCO₃ (12,6g), submetendo à agitação magnética por 10 min. Adicionou-se lentamente 1,7 mL de uma solução saturada de K₃[Fe(CN)₆] (0,54g, 1,62 mmol, 1 eq.g.). Em seguida, adicionou-se mais 5 mL da solução de NaHCO₃ e a mistura foi agitada por um período de 24 horas e então tratada com solução de HCl a 10% até pH 5, ocorrendo precipitação. Após tratamento com carvão ativado o produto foi cristalizado em etanol para obtenção do **siringaresinol (5)**

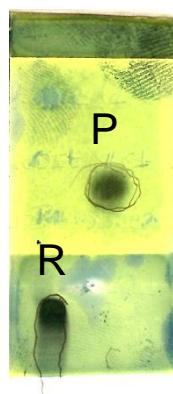
II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 REAÇÃO #SL-1

O início da rota sintética para as lignanas furofurânicas se dá através de uma reação de metilação na carboxila do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, para formação do éster correspondente. Este procedimento foi adaptado da síntese realizada por Bazin et. al (2008), a qual utiliza o ácido ferúlico como precursor da rota sintética. A escolha do reagente foi devido à disponibilidade imediata do material para iniciar a síntese.

A reação de alquilação (metilação) na carboxila do ácido para obtenção do derivado éster tem a finalidade de proteção da função hidroxila, alterando a reatividade da molécula. Assim, prepara-se um reagente que pode ser utilizado na próxima etapa da síntese (#SL-2), a qual necessita de uma substância livre da função carboxila. A reação se processa em meio ácido, via substituição nucleofílica S_n2 . O MeOH é utilizado como doador do grupo metoxila e adicionado em excesso estequiométrico, de modo a certificar da totalidade da reação, evidenciada pela análise em CCDA (Figura 7, p.56) dos Rf do reagente (R) e produto (P).

Figura 7 – Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-1



II.3.2 REAÇÃO #SL-2

Os trabalhos de Negi et al. (2005) mostraram um método simples e eficiente para a desproteção regioseletiva da posição *para* de acil-benzenos *p*-metoxilados. Esse processo é frequentemente utilizado na preparação de moléculas complexas. Com base nessa mesma lógica e mecanismo, utilizou-se o sistema cloreto de alumínio/diclorometano em uma tentativa de desproteção regioseletiva da posição *para* do éster metílico do ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (2), promovendo a desproteção seletiva nesta posição. Outro trabalho desenvolvido por Mateeva et al. (2002) utiliza o AlBr₃ como agente demetilante da posição *para* na síntese de novos derivados de flavonóides com ação inibidora da HIV-integrase. Houve uma demetilação seletiva no grupo 5-metoxi, enquanto o restante dos grupos metoxila da molécula permaneceram inalterados.

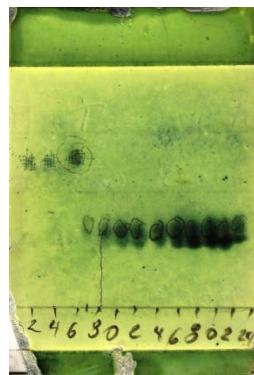
Para o experimento, foi necessária a montagem de um ambiente sob vácuo e atmosfera de nitrogênio, visto que o cloreto de alumínio sofre rápida decomposição e requer ambiente livre de umidade. A adição do CH₂Cl₂ seco ao AlCl₃ resultou na formação de uma suspensão amarelo-clara. Após a adição do reagente, observou-se o surgimento de uma coloração castanho-avermelhada, com formação de dois tipos de sólidos: um branco fino e outro amarelado, mais grosso e grumoso. A utilização do banho de gelo foi devido à natureza bastante exotérmica no início da reação. Após cessar a reação pela adição de H₂O verificou-se mudança da coloração castanho-avermelhada para um aspecto leitoso, com precipitado.

As análises por CCDA (Figura 8, p. 58) após purificação do produto mostraram uma reação não completa, entretanto com produto mais polar que o reagente inicial. A fração 7-29, teoricamente, continha o produto, já que um menor valor de Rf apresentado é indicativo de maior polaridade, justificável pela retirada do grupo metila na posição *para*, objetivo da reação desenvolvida. Após análise de ¹H-RMN o composto apresentou sinais que caracterizavam a inserção da hidroxila em *para*, o que levou a afirmar que a reação foi bem sucedida.

Segundo Negi et al. (2005), o uso do sistema AlCl₃ / CH₂Cl₂ foi efetivo na demetilação-*para*-seletiva em éteres aril-metílicos contendo um grupo éster ou cetona na posição *para*. A desproteção em *para* é facilitada pela natureza retiradora de elétrons da carbonila complexada com o ácido de Lewis (AlCl₃), promovendo a deslocalização de elétrons no sistema conjugado e favorecendo a reatividade *para*-

dirigida. Entretanto, esta reação não ocorreria com grupos carboxila livres, o que justifica a metilação prévia desenvolvida em #SL-1. Este procedimento também foi relatado em outros derivados do ácido cinâmico com sucesso, apresentando rendimento de 50% (RAMANJANEYULU et al., 2011).

Figura 8 – Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-2.



II.3.3 REAÇÃO #SL-3

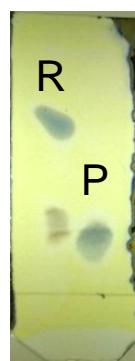
A próxima etapa da hemi-síntese envolvia a redução do éster *para*-hidroxilado fornecendo o álcool sinapílico, um fenilpropanóide precursor das lignanas. Este procedimento utiliza o hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL-H) em tetrahidrofurano (THF) como agente redutor nucleofílico, funcionando como doador de íons hidreto. Trata-se de um reagente muito útil para a conversão de ésteres em aldeídos e alcoóis, além da propriedade em fornecer reduções químio e estereoseletivas, no caso de compostos carbonílicos insaturados (WINTERFELDT, 1975). O DIBAL-H reage fortemente com o ar e água, podendo levar a incêndios. Para evitar isto, utilizou-se atmosfera de nitrogênio e vácuo nas reações, além do solvente aprótico THF.

Quideau e Ralph (1992) relatam esse procedimento de redução com DIBAL-H como método simples e eficiente na conversão de ésteres cinâmicos nos alcoóis coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico. A partir dessa lógica, desenvolveu-se a reação proposta. O DIBAL-H foi preparado em excesso estequiométrico (3 eq.g), de forma a promover a redução eficiente para a função álcool, adicionando-se gota-a-gota sob baixa temperatura, devido à sua alta reatividade. Após cessar a reação pela adição

de H₂O percebeu-se turvação e formação de uma fase amarelada (aquosa), a qual contém um precipitado gelatinoso dos sais de alumínio.

Essa reação (p.54) foi desenvolvida de forma satisfatória, obtendo-se um óleo incolor contendo impurezas. Um problema decorrente da reação foi a formação de polímeros indesejáveis do produto com o passar do tempo, prejudicando a obtenção do álcool em sua forma pura. Esse álcool é instável e deve ser acondicionado em geladeira, conforme recomendado pela *Sigma-Aldrich*. O tempo de reação com o DIBAL-H foi bastante longo (24h), o que pode ter contribuído para a formação dos produtos indesejáveis. Para contornar este problema, desenvolveu-se outras tentativas de reação com o DIBAL-H, com 1 hora de duração, realizando-se as etapas em menor tempo possível para evitar alterações que poderiam ocorrer com o produto, na qual foi possível obter um óleo incolor, contendo o **álcool sinapílico (4)**.

Figura 9 - Cromatografia em camada delgada analítica da reação #SL-3. (R) Reagente; (P) Produto



II.3.4 SÍNTSE #SL-4

Com a formação do álcool sinapílico (4), a próxima etapa para a formação do esqueleto básico das lignanas se dá através do acoplamento oxidativo entre duas unidades do álcool reagente, em processo similar ao que ocorre na biossíntese, daí este processo ser classificado como síntese biomimética (DIAS, 1988).

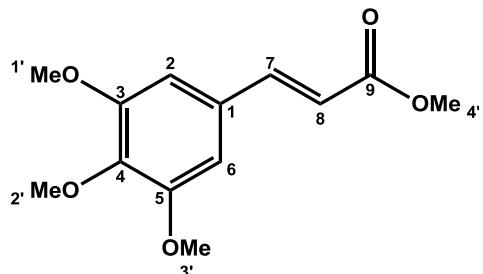
O ferricianeto de potássio atua como um forte agente oxidante, com capacidade superior em meio alcalino. A espécie oxidante é um complexo iônico acceptor de elétrons, que mimetiza os sistemas biológicos do tipo citocromo, envolvendo transferência de um elétron. Ao abstrair um elétron de um sistema aromático ou hidroxila, promove a formação do radical fenóxi ou hidróxi e, através da deslocalização de elétrons pelos sistemas conjugados da molécula, o radical sofre acoplamento dimérico de modo a originar o produto (DIAS, 1988). Isto explica a necessidade da desproteção na posição *para* no álcool sinapílico, caso contrário os efeitos de ressonância seriam diminuídos, sem a formação de estruturas de ressonância e o acoplamento não ocorreria.

Bortolomeazzi et al. (2010) relatam este acoplamento oxidativo do eugenol e isoeugenol para a formação do dehidrodieugenol e dehidroisoeugenol, respectivamente, avaliando suas propriedades antioxidantes. Dessa forma, o acoplamento do álcool sinapílico para a formação do siringaresinol (p. 55) se utiliza do mesmo mecanismo, com algumas modificações.

O meio reacional com o reagente foi previamente basificado, visto que o ferricianeto de potássio possui um melhor potencial oxidante no meio alcalino. O produto obtido da síntese apresentou-se na forma de sólido branco-amarelado, sendo submetido à espectroscopia de RMN de ^1H . Verificou-se muitas impurezas no espectro e sinais não-condizentes com a estrutura do siringaresinol, levando a crer em falha no processo sintético. Dentre os motivos que podem ter prejudicado a reação está a rápida adição do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ no meio reacional. Bortolomeazzi et al. (2010) relataram uma adição lenta do agente oxidante (4 a 5 horas), o que não foi possível de ser realizado. A difícil purificação do produto é outro fator problemático, visto que o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ pode gerar uma série de compostos pelo acoplamento oxidativo, em processo não-seletivo estereoquimicamente. Mas talvez o principal problema seja devido às impurezas do reagente, proveniente das etapas anteriores da rota sintética e ao processo de polimerização do álcool sinapílico.

II.3.5 ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS

Tabela 2 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C -RMN do produto de #SL-1.



C	δ_{C}	δ_{H}
1	130,0	-
2	105,3	6,72 (s, 2H)
3	153,5	-
4	140,2	-
5	153,5	-
6	105,3	6,72 (s, 2H)
7	145,0	7,62 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	117,1	6,36 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
9	167,5	-
1'	56,3	3,86 (s, 6H)
2'	61,1	3,85 (s, 3H)
3'	56,3	3,86 (s, 6H)
4'	51,0	3,78 (s, 3H)

Figura 10 - Espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-1 (CDCl_3 , 200 MHz).

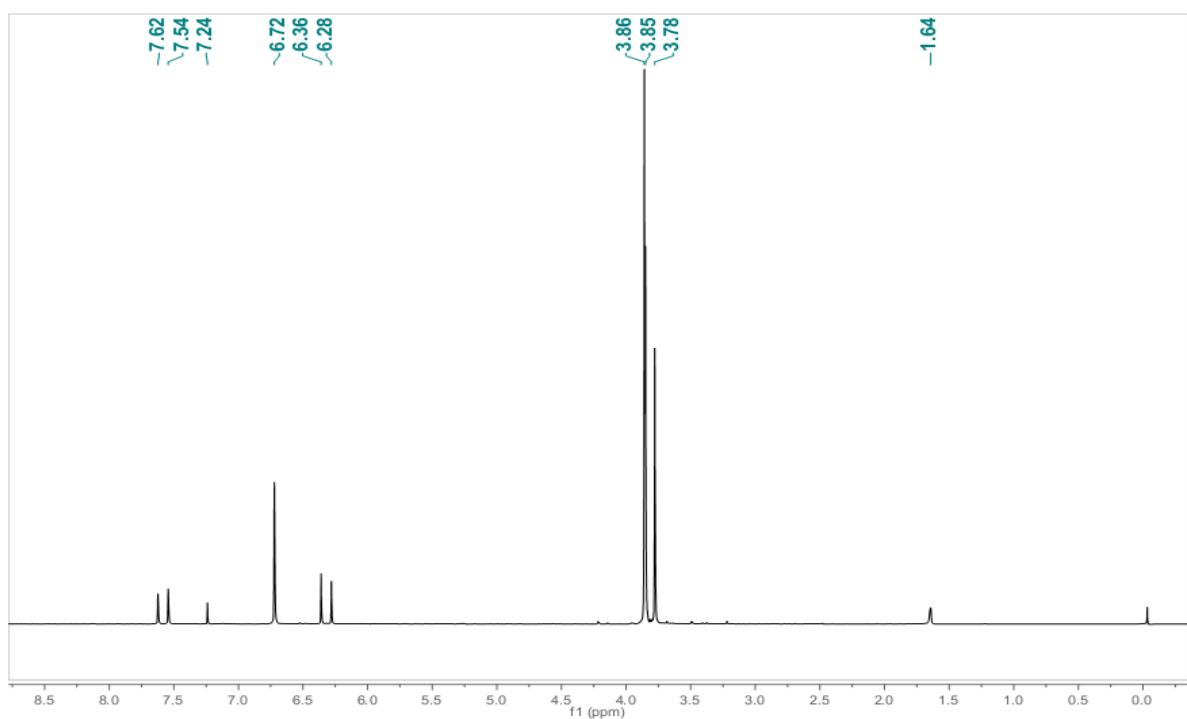


Figura 11 - Expansão do espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-1 na região de 7,7 a 6,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

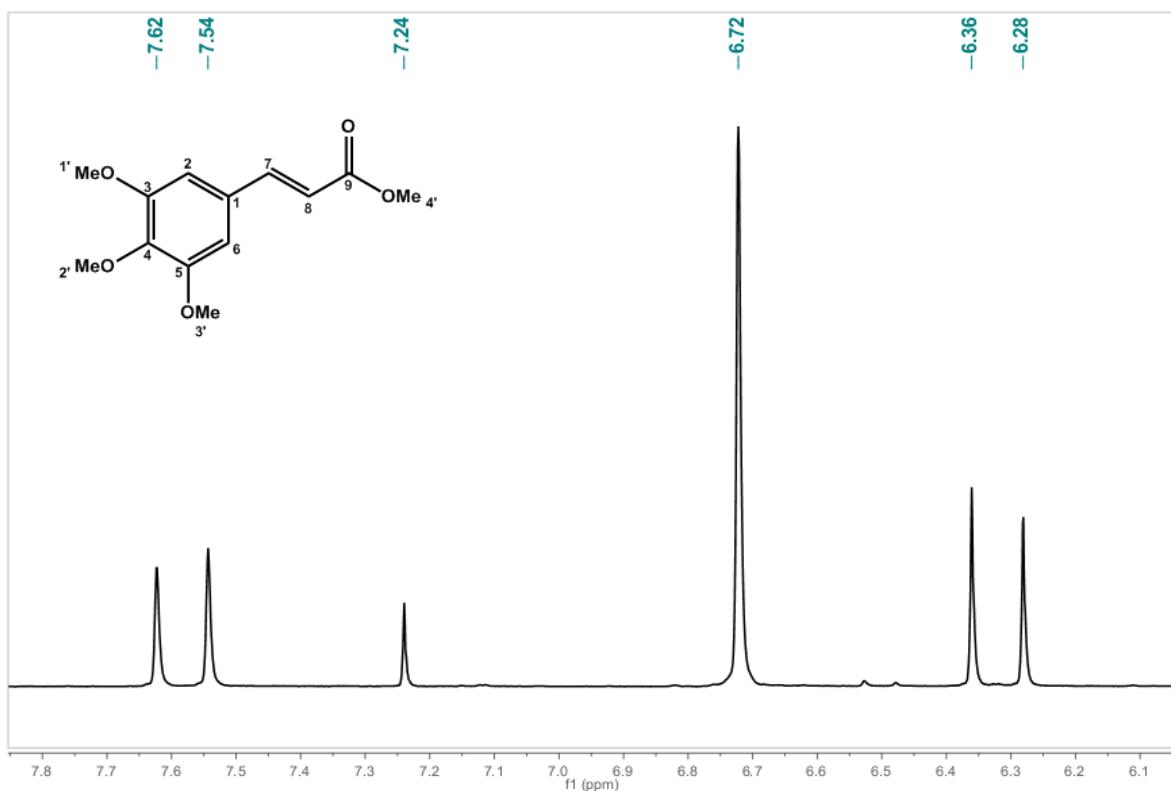


Figura 12 - Expansão do espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-1 na região de 4,0 a 3,5 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

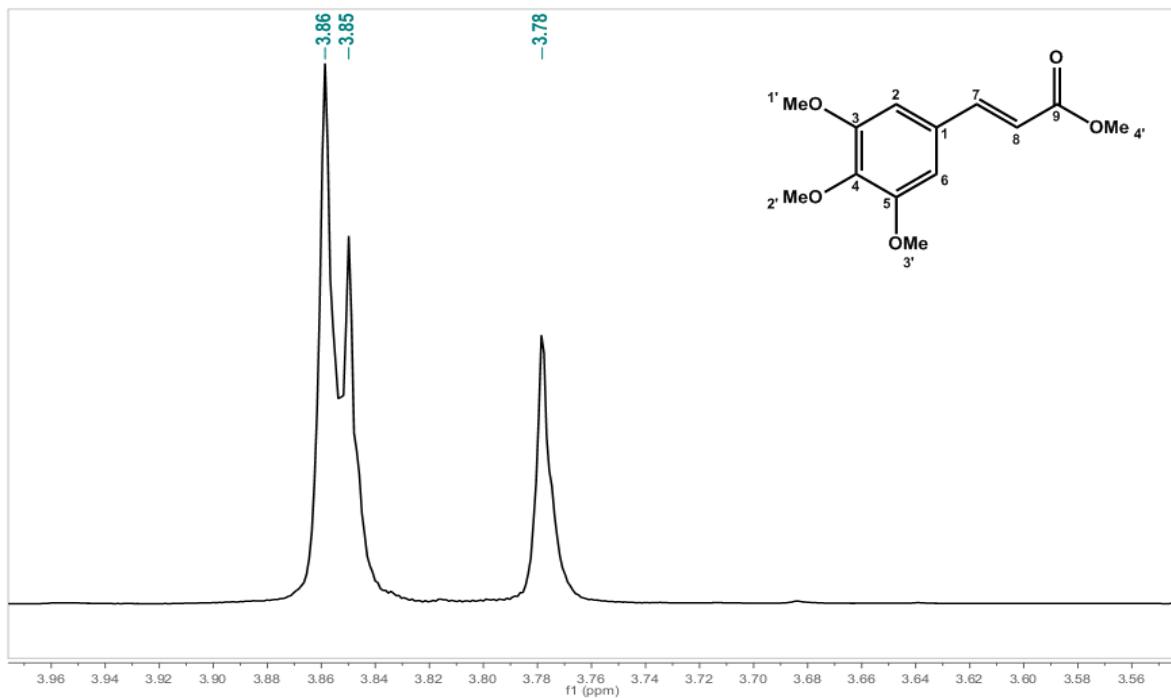
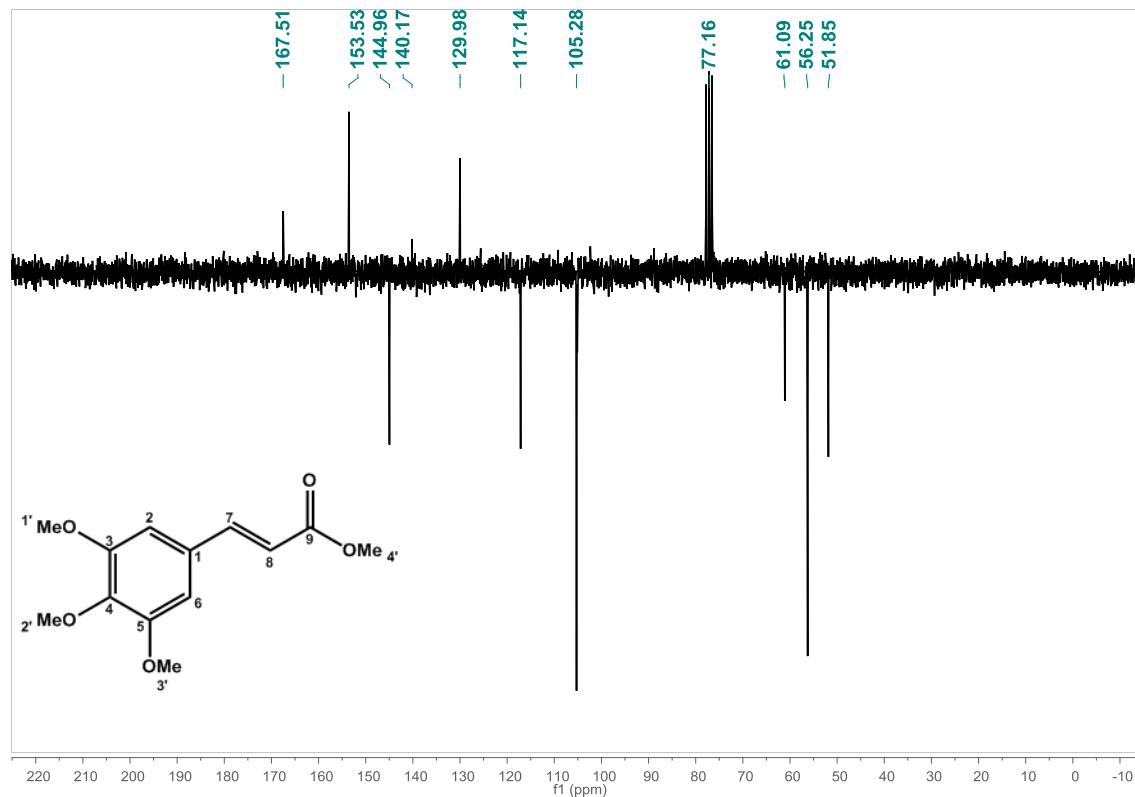
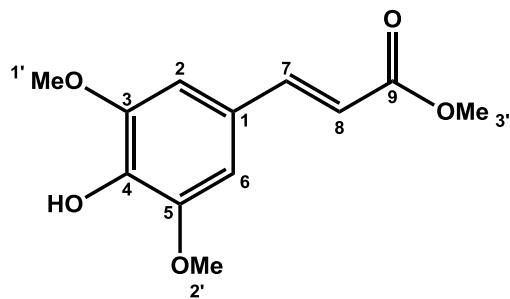


Figura 13 - Espectro de ^{13}C -RMN (APT) do produto de #SL-1 (CDCl_3 , 125 MHz).**Tabela 3 - Dados espectrais de ^1H e ^{13}C -RMN do produto de #SL-2.**

C	δ_{C}	δ_{H}
1	126,0	-
2	105,1	6,75 (s, 2H)
3	147,3	-
4	137,2	-
5	147,3	-
6	105,1	6,75 (s, 2H)
7	145,3	7,62 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	115,7	6,32 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
9	167,4	-
1'	56,5	3,90 (s, 6H)
2'	56,5	3,90 (s, 6H)
3'	51,8	3,78 (s, 3H)
OH	-	5,8 (sl)

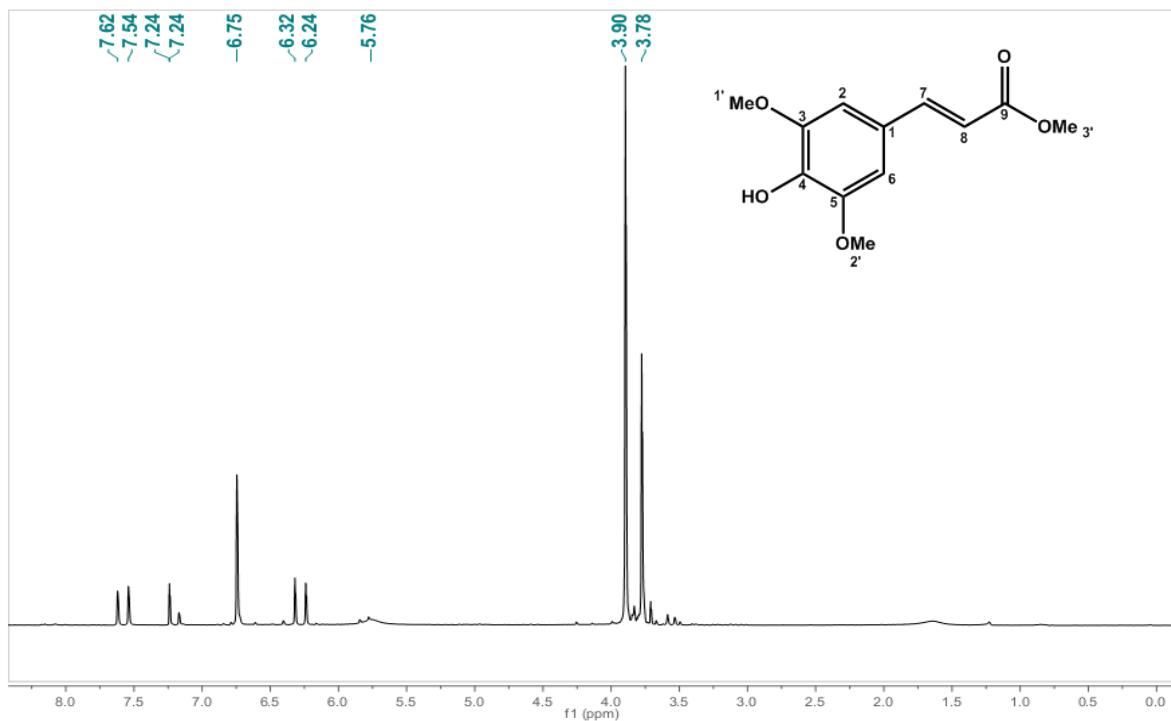
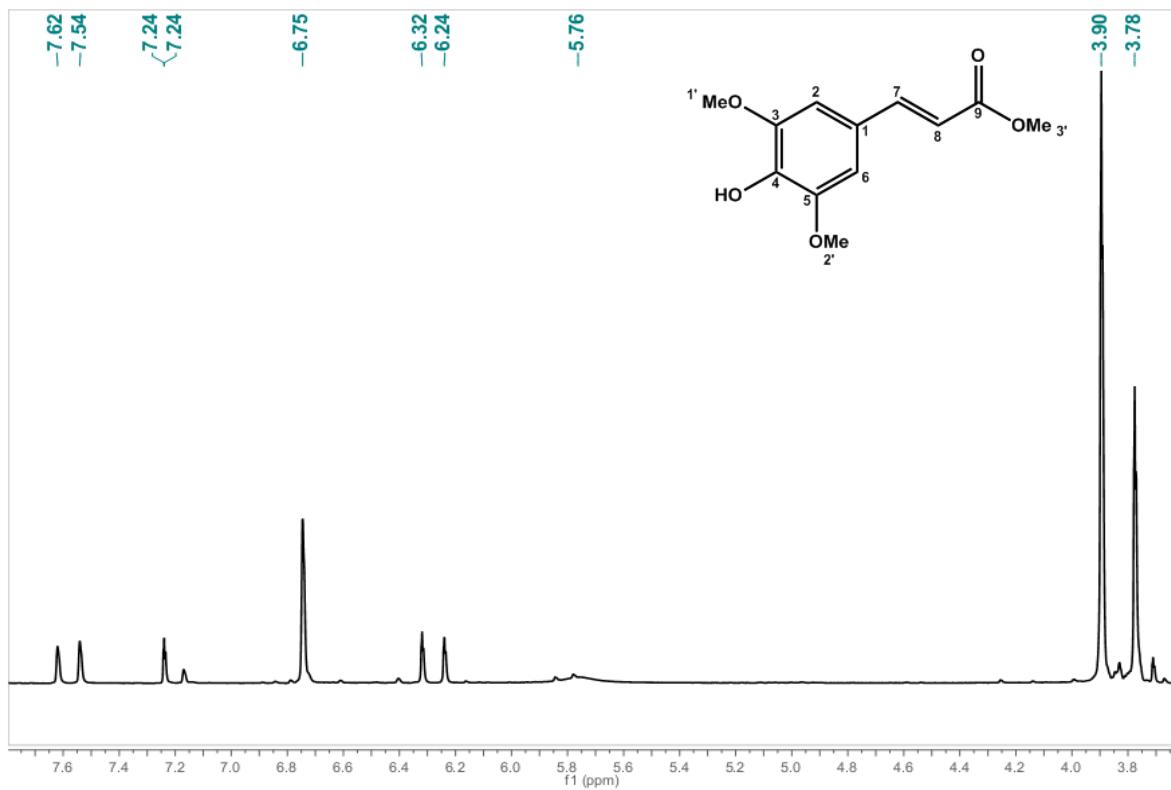
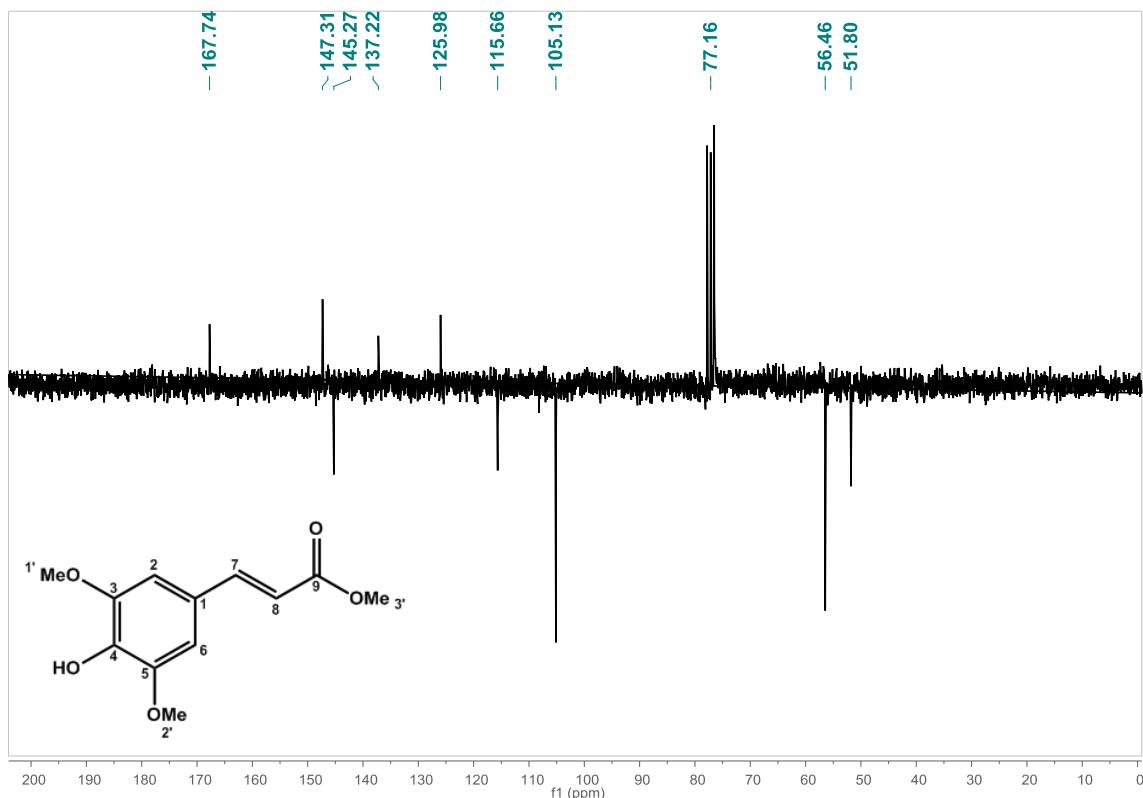
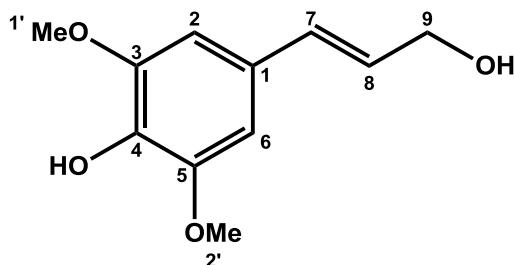
Figura 14 - Espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-2 (CDCl_3 , 200 MHz).**Figura 15** - Expansão do espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-2 na região de 7,8 a 3,6 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

Figura 16 - Espectro de ^{13}C -RMN (APT) do produto de #SL-2 (CDCl_3 , 125 MHz).**Tabela 4 - Dados espectrais de ^1H -RMN do produto de #SL-3.**

C	δ_{C}	δ_{H}
1		-
2		6,78 (s, 2H)
3		-
4		-
5		-
6		6,78 (s, 2H)
7		6,71 (d, $J = 15,0$ Hz)
8		6,47 (d, $J = 15,0$ Hz)
9		4,48 (dd, 2H)
1'		4,03 (s, 6H)
2'		4,03 (s, 6H)
OH		5,58 (s), 1,75 (s)

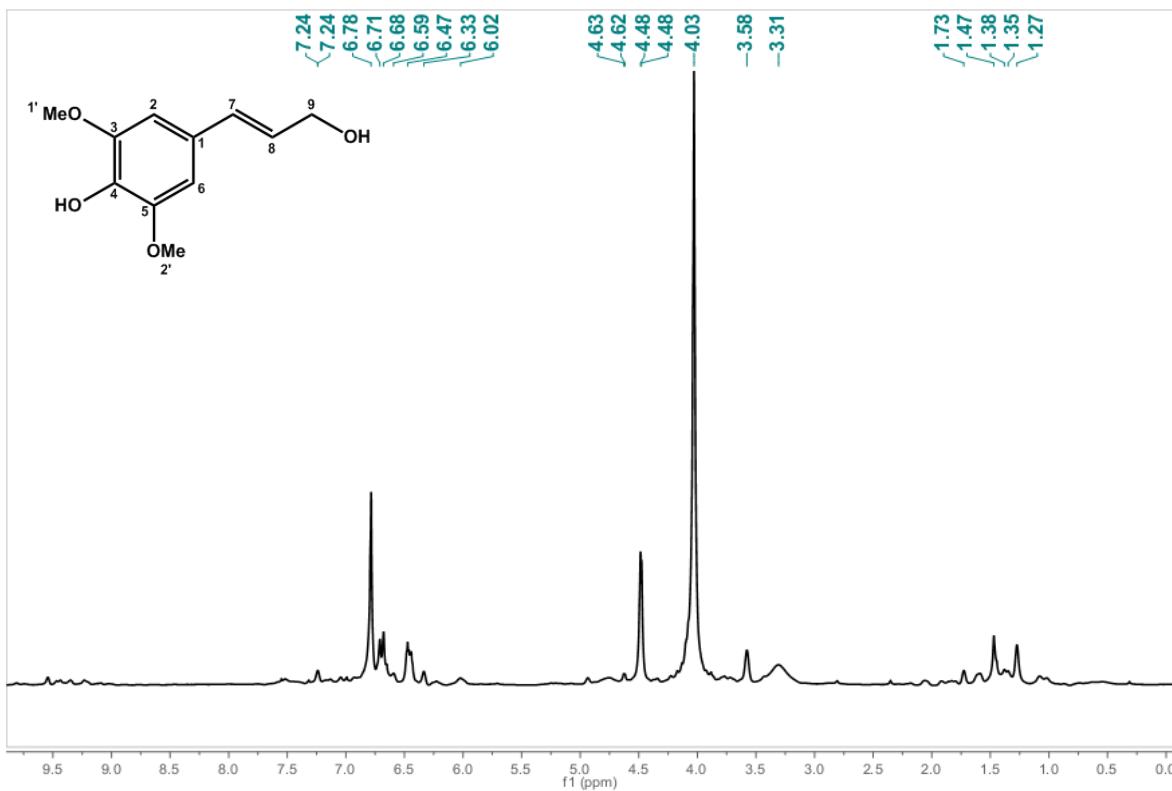
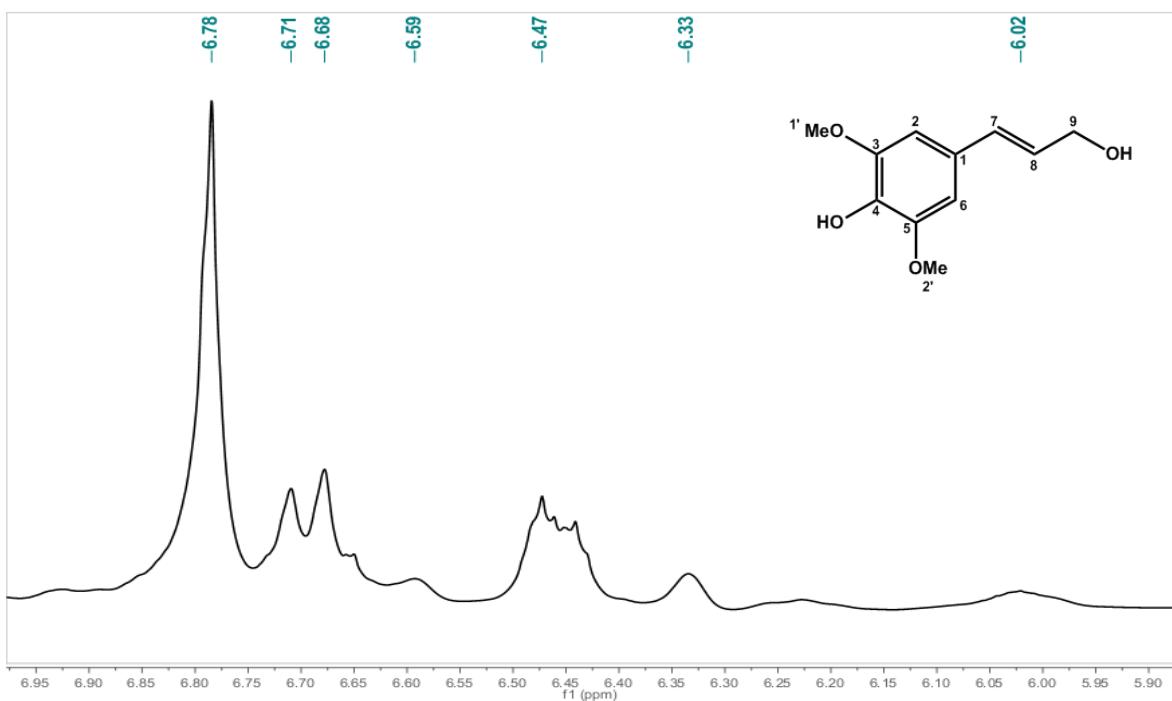
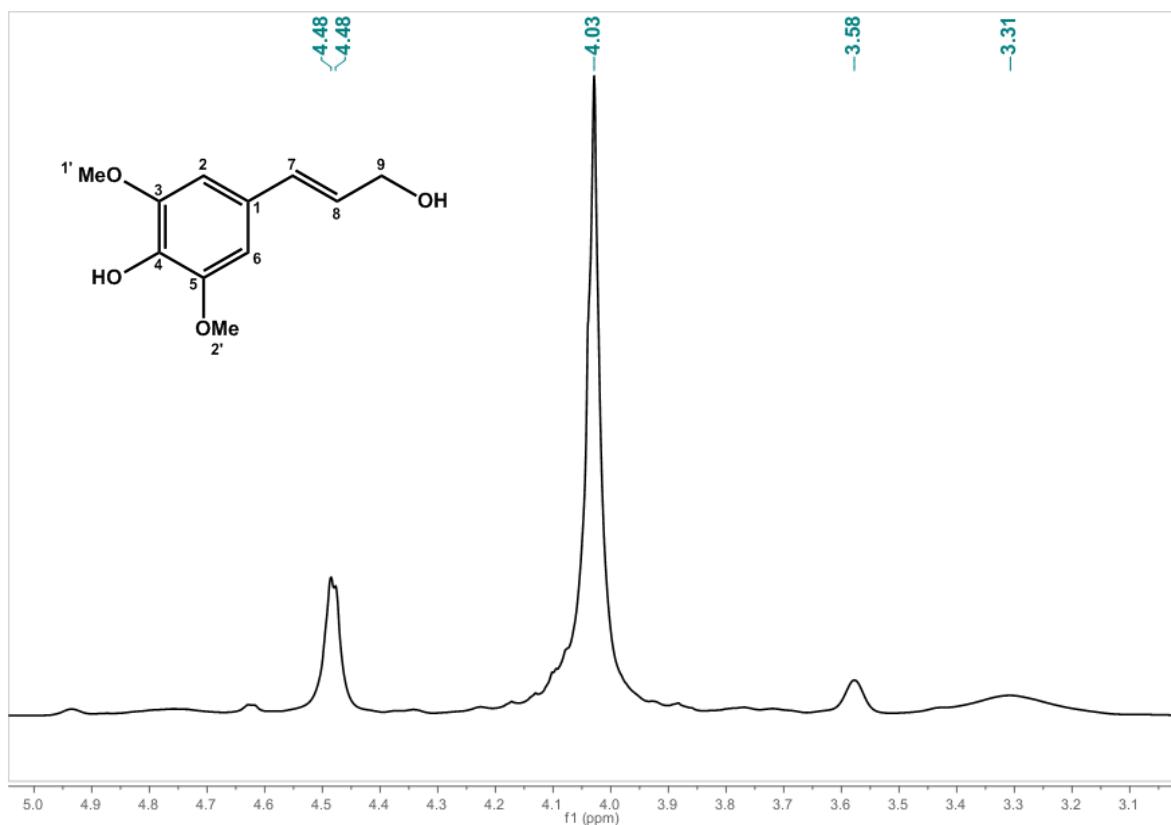
Figura 17 - Espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-3 (CDCl_3 , 500 MHz).**Figura 18** - Expansão do espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-3 na região de 7,3 a 5,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 19 - Expansão do espectro de ^1H -RMN do produto de #SL-3 na região de 5,0 a 3,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).



II.4 PERSPECTIVAS

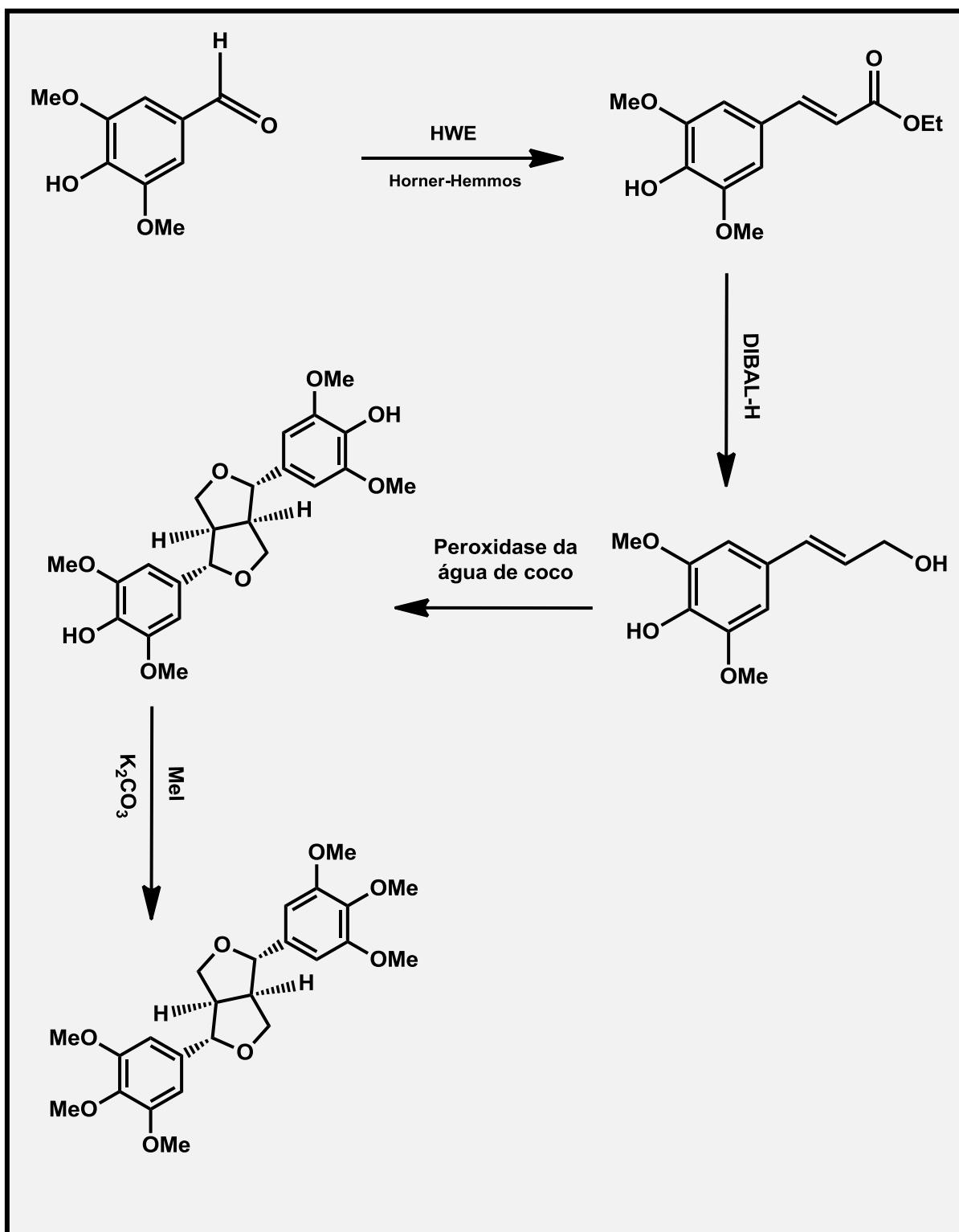
O processo de síntese da iangambina envolve uma série de etapas com a formação de intermediários, em que o produto de uma etapa anterior serve de reagente da etapa seguinte. Assim, faz-se necessário que todos os intermediários sejam obtidos de forma satisfatória para finalizar a rota sintética. Infelizmente, não se obteve a iangambina como produto final, devido a uma série de problemas encontrados durante a realização das sínteses, dentre os quais podemos elencar:

1. O acoplamento oxidativo do fenilpropanóide para a formação do esqueleto básico das lignanas, promovido pelo agente oxidante (síntese #SL-4) é uma etapa crucial para a conclusão da proposta sintética. Esta reação não ocorreu adequadamente, sendo necessário otimizar as condições reacionais, reagentes utilizados, etc.
2. Para que ocorra a formação da iangambina, exclusivamente, faz-se necessário o emprego de reagentes quirais, que promovam o acoplamento oxidativo de modo estereosseletivo, conforme demonstrado por Jung et al (2006). O ferricianeto de potássio poderia ser empregado para a formação de uma série de lignanas racêmicas.
3. Há uma certa exigência e cuidado especial nos rendimentos de cada reação para que se obtenha o produto final com quantidade suficiente, visto que em cada etapa de reação a quantidade do produto que se forma é cada vez menor.

Apesar disso, a rota desenvolvida é uma nova abordagem sintética para formação das lignanas furofurânicas, dispensando aparelhagens complexas e utilizando reagentes de fácil obtenção. Como perspectivas, objetivou-se: a utilização da peroxidase natural da água de coco e peroxidase comercial como agentes oxidantes; obter o álcool sinapílico (produto de # SL-3) em maior grau de pureza. Uma alternativa consiste na utilização do 3,4,5-trimetoxi-benzaldeído como reagente de partida, o qual contém grupo hidroxila na posição *para*, de modo a facilitar as outras etapas e assim, viabilizando a síntese em quatro etapas simples.

Nesse sentido, foi desenvolvido uma nova proposta para a síntese da iangambina, a partir do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e utilizando a peroxidase da água de coco da Paraíba (João Pessoa - PB) como agente oxidante, na etapa de acoplamento oxidativo para formação do esqueleto da lignana de modo estereosseletivo. Esse procedimento foi realizado com sucesso em colaboração com o Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues, obtendo-se a iangambina sintética em quatro etapas reacionais simples, com bons rendimentos. Foi feita comparação dos dados espectroscópicos com a iangambina natural, constatando-se que houve formação apenas da lignana em sua série normal, sem quantidades significantes de seus isômeros.

O método utiliza a peroxidase natural presente na água de coco numa reação de biotransformação enzimática e também foi realizada com sucesso para a síntese da licarina, uma neolignana. Um esquema simplificado da nova rota sintética da iangambina está demonstrado no Esquema 3, p.70. As informações sobre a realização das etapas reacionais foram omitidas devido a motivos de pedido de patente do método.

Esquema 3 – Nova rota sintética para síntese estereoseletiva da iangambina

Capítulo III

Desenvolvimento e Avaliação dos métodos de extração

III.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III.1.1 ASPECTOS GERAIS DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

O processo de extração de solutos utilizando solventes é utilizado em muitos processos químicos, biotecnológicos e farmacêuticos como forma de recuperação de analitos de interesse. Nas espécies vegetais os metabólitos secundários estão presentes em pequenas quantidades, porém o alto valor agregado a esses produtos justificam o desenvolvimento de processos de extração sofisticados, que sejam efetivos em extrair os componentes da forma mais criteriosa e produtiva possível, sem perda de atividade e com alta pureza (SHIRSATH et al., 2012; STARMANS & NIJHUIS, 1996).

De modo geral, mais de um tipo de técnica de extração pode ser empregada para uma determinada amostra, com diversos processos de separação e purificação empregados, dependendo da classe química da substância, matéria-prima utilizada e aplicação final, o que acaba dificultando a escolha do processo. A técnica deve ser simples, rápida, de baixo custo, fornecer amostras relativamente livres de interferentes, ter alta recuperação e boa exatidão e precisão para os analitos de interesse. (QUEIROGA, 2010; QUEIROZ et al., 2001).

O princípio base do processo de extração de produtos naturais é a dissolução preferencial de uma ou mais substâncias da matriz (produto natural) em um solvente líquido. A escolha do solvente é baseada nos fatores inerentes ao processo como solubilidade do constituinte no solvente, estabilidade, toxicidade, disponibilidade, viscosidade, reatividade, tensão superficial e custo do solvente. Outros fatores que podem interferir diretamente no perfil do extrato obtido e rendimento do processo são o tamanho de partícula, teor de umidade, a natureza da matéria-prima (local da coleta, idade e parte da planta utilizada) e a localização do constituinte químico na matriz vegetal (extracelular, intracelular, entre outros) (PEREIRA, 2011).

III.1.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

A extração líquido-líquido (ELL) é uma operação unitária de transferência de massa e baseia-se no mecanismo de partição da amostra entre duas fases líquidas imiscíveis (orgânica e aquosa). O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. A eficiência da extração depende principalmente do coeficiente de partição ($\log P$) do analito em uma das fases, além da constante de dissociação ácida (pK_a), estabilidade no meio de extração, proporção relativa entre as fases e o número de extrações (CESAR, 2000; QUEIROZ et al., 2001).

A ELL apresenta as vantagens de ser uma técnica simples (geralmente usa-se um funil de separação ou tubos de centrífuga para as extrações) e poder utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Por outro lado, esta técnica possui uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito; impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes, além da toxicidade apresentada por alguns solventes orgânicos. Ainda assim, a ELL é considerada uma técnica clássica para a preparação de amostras, sendo ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (QUEIROZ et al., 2001).

III.1.3 EXTRAÇÃO POR SOXHLET

A extração de amostras sólidas por solventes, conhecida como extração sólido-líquido, lixiviação ou “leaching” é um dos métodos mais antigos de pré-tratamento de amostras. Tem a função de remover e separar substâncias de interesse das frações insolúveis de alto peso molecular e outros compostos que podem interferir com etapas subsequentes do processo analítico. Classicamente, a

maceração era a técnica utilizada para este processo, baseada na escolha adequada dos solventes, uso da temperatura e agitação. Entretanto, após o desenvolvimento do extrator de Soxhlet em 1879, esta técnica de extração sólido-líquido tornou-se padrão e vem evoluindo ao longo dos anos para se adequar as técnicas mais modernas de preparação de amostras (LUQUE DE CASTRO, 2010).

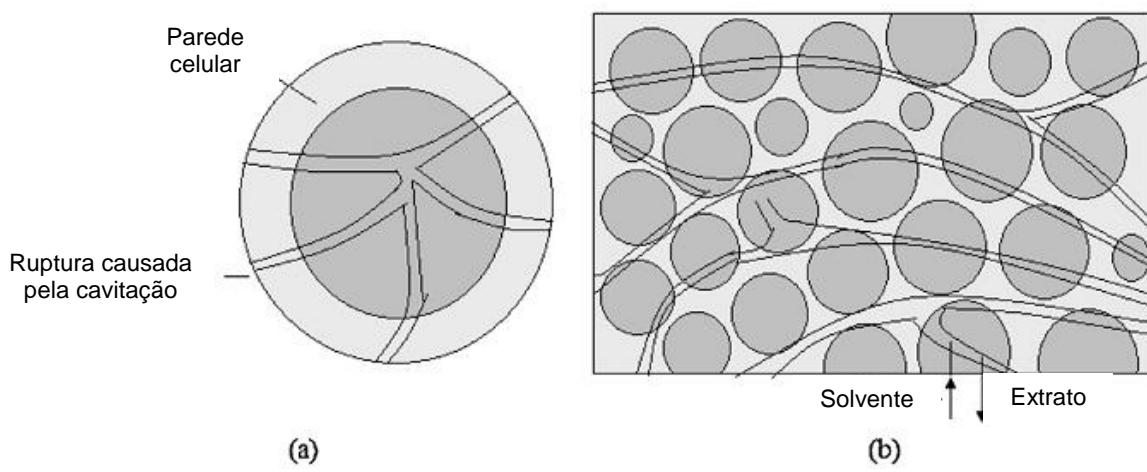
Tradicionalmente, o aparelho de Soxhlet possui um cartucho no qual a amostra é colocada, sendo gradualmente preenchida com o solvente extrator condensado de um balão de destilação. Quando o líquido alcança o nível de transbordar, um sifão transporta o conteúdo extraído do cartucho, retornando-o ao balão com o solvente extrator. Esse processo é repetido de forma contínua até o término da extração. Algumas vantagens da utilização do Soxhlet estão no fato que a amostra entra em contato repetidamente com porções recém-destiladas do solvente extrator; o sistema permanece a uma temperatura relativamente alta, facilitando a permeação do líquido no cartucho de extração; não há necessidade de filtração após o processo; há a possibilidade de múltiplas extrações simultâneas em paralelo, pelo baixo custo do equipamento básico. Como desvantagens do Soxhlet em relação à outros métodos estão o longo tempo necessário para extração e a grande quantidade do solvente extrator utilizada, implicando em problemas ambientais em seu descarte; pode haver termodecomposição de compostos termolábeis; não há agitação durante o processo extractivo; é de difícil automação (LUQUE DE CASTRO, 2010).

III.1.4 EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

Recentemente, a aplicação da técnica de ultrassom na extração de produtos naturais vem atraindo a atenção, principalmente devido à eficácia em concentrar maior teor de princípios ativos. A intensificação na eficácia utilizando ultrassom é atribuída à propagação de ondas ultra-sônicas de alta pressão pelo solvente, resultando no fenômeno conhecido como cavitação. O mecanismo da extração é geralmente atribuído aos efeitos mecânicos, térmicos e cavitação, os quais podem causar ruptura da parede celular, redução do tamanho de partícula e um melhor fluxo de transferência de massa pelas membranas celulares (SHIRSATH et al., 2012). Os ciclos de compressão e expansão que o material sofre pelo efeito do

ultrassom promovem a formação de bolhas de líquido que, devido ao seu crescimento ao longo dos ciclos, entram em colapso provocando então a quebra da parede celular, conforme mostrado abaixo (Figura 20, p. 75) (PEREIRA, 2011).

Figura 20 – Mecanismo da ruptura da parede celular vegetal: (a) ruptura devido à cavitação, (b) difusão do solvente pela estrutura celular



Adaptado de: SHIRSATI et al., 2012

Dessa forma, a aplicação do ultrassom permite a dissolução dos constituintes no solvente próximo, acelerando a obtenção em menor tempo. Entretanto, depois de um certo limite há um desperdício da energia ultra-sônica, já que não ocorre um aumento da extração, devido às limitações do equilíbrio extrativo (PEREIRA, 2011).

Além da maior eficiência extrativa proporcionada pelo ultrassom, os fluxos turbulentos e acústicos podem aumentar significativamente os coeficientes de transferência de massa sólido-líquido devido a efeitos em microescala no sistema; há um aumento na superfície de contato entre as fases sólido-líquida pela possibilidade de redução do tamanho da matriz sólida (SHIRSATI et al., 2012).

Dessa forma, pode-se afirmar que as principais vantagens da utilização do ultrassom nos processos extractivos estão na redução do tempo de extração, com rendimentos satisfatórios; operação em baixas temperaturas, possibilitando a extração de constituintes voláteis ou termolábeis; baixo consumo de solventes e altas recuperações dos produtos, com alta pureza (SHIRSATI et al., 2012).

III.2 PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas do caule e folhas de *Ocotea duckei* foram coletadas em fevereiro de 2010, no município de Santa Rita, estado da Paraíba. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (Cbiotec/UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN / UFPB) sob o código AGRA 4309. A esta coleta, atribuiu-se a denominação Coleta F10.

Uma outra coleta das cascas do caule e folhas foi realizada em Abril de 2011, no município de Santa Rita-PB. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Rita Baltazar de Lima, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/UFPB), com exsicata sob o código Lauraceae - *Ocotea duckei* Vattimo-Gil - JPB 47351. A esta coleta, atribuiu-se a denominação Coleta A11.

III.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB)

Para a coleta F10, utilizou-se 5,4kg das cascas do caule e 5,3kg das folhas totalizando 10,7 kg de material vegetal. Este foi desidratado em estufa de ar circulante à temperatura média de 45°C sendo em seguida pulverizado com auxílio de um moinho mecânico, obtendo-se o pó seco da planta (10 kg). Após isso, o pó foi submetido a extração com etanol à 95%, sendo esse processo repetido por 3 vezes, em intervalos de 5 dias para cada extração. Ao total, foi utilizado cerca de 93 L de etanol para a extração, obtendo-se a solução extrativa etanólica, a qual foi concentrada em evaporador rotativo a 50 °C, para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB F10, 1,63 kg), com rendimento de 16,3% em relação ao pó seco da planta (Esquema 4, p.78). O mesmo procedimento foi realizado para a coleta A11, com um total de 15 kg do material vegetal para obtenção de 2,4 kg do extrato bruto (rendimento de 16,17%). Os extratos das duas coletas foram analisados em relação ao seu perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

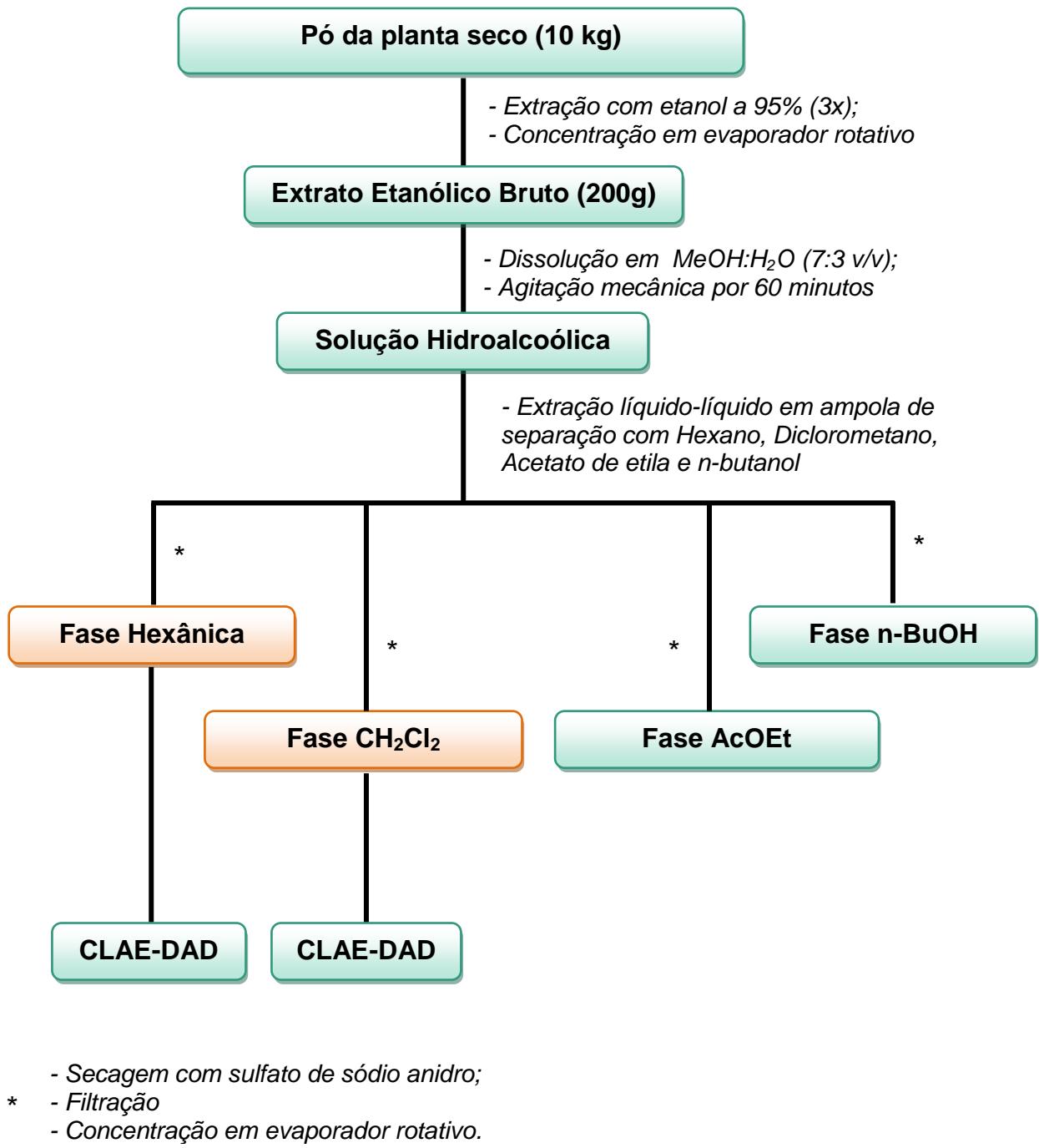
III.2.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

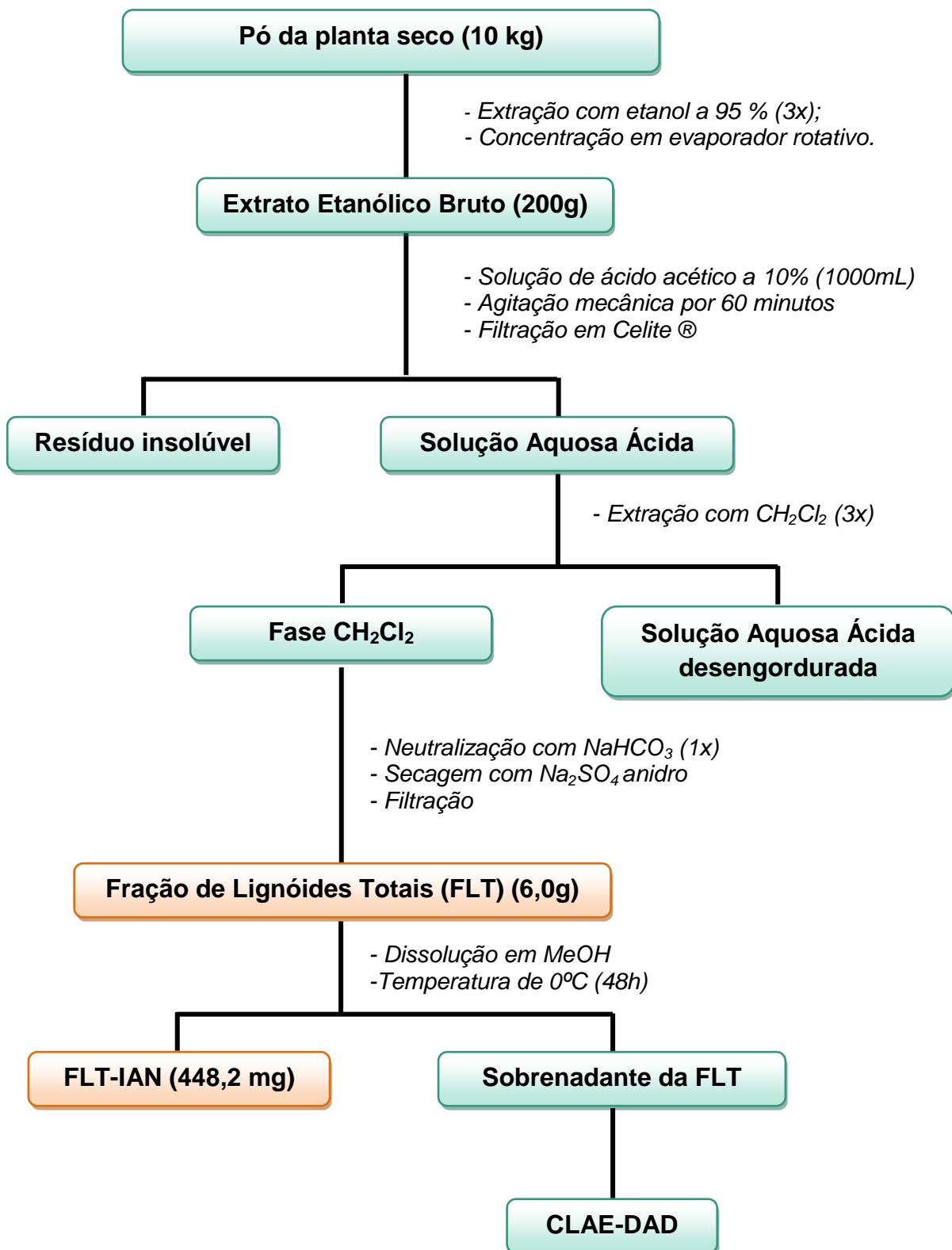
200g do EEB F10 foram dissolvidos em 1000 mL de uma solução de MeOH/H₂O (7:3 v/v) e homogeneizado sob agitação mecânica durante aproximadamente 60 minutos. A solução hidroalcoólica resultante foi submetida a uma extração líquido/líquido em ampola de separação utilizando solventes em grau crescente de polaridade: hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e N-butanol (n-BuOH), obtendo-se as respectivas fases orgânicas. As soluções foram tratadas com Na₂SO₄ anidro e submetidas à filtração. Após esse processo, os solventes foram evaporados a pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C para obtenção das fases orgânicas concentradas. Para o estudo, foram selecionadas as fases hexânica e diclorometano, as quais foram avaliadas por CLAE-DAD em relação ao perfil cromatográfico (Esquema 4, p.78).

III.2.4 MARCHA DE ISOLAMENTO DE LIGNÓIDES

Com a finalidade de obter a iangambina com maior rendimento, avaliou-se a metodologia descrita por Barbosa-Filho et al. (1999) para o isolamento dos lignóides totais de *Ocotea duckei*. (Esquema 5, p.79). Cerca de 200g do EEB F10 foram suspensos em 1000 mL de uma solução de ácido acético a 10% e homogeneizados durante 60 min em agitador mecânico (IKA-RW-20) sendo em seguida filtrado sob Celite ®, obtendo-se um resíduo insolúvel e a solução aquosa ácida. Essa solução foi extraída em ampola de separação com 3x500 mL de CH₂Cl₂ para obtenção da fase diclorometano, a qual foi tratada com solução de NaHCO₃ (1x), Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo a fração de lignóides totais (FLT) de *O.duckei*, com rendimento de 3,0 % em relação ao peso do EEB utilizado. A FLT foi dissolvida em 75 mL de MeOH e colocada no freezer por um período de 48h, obtendo-se um precipitado, iangambina (FLT-IAN, 448 mg). O sobrenadante da FLT foi submetido à cromatografia em coluna (CC) e CLAE-DAD para avaliação do perfil cromatográfico, bem como CLAE-DAD semi-preparativa para isolamento dos lignóides (Capítulo IV). Essa metodologia também foi avaliada através de um estudo comparativo da eficiência extrativa entre a agitação mecânica e a extração por ultrassom.

Esquema 4 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB F10) de *Ocotea duckei* Vattimo



Esquema 5 – Marcha de isolamento dos lignóides totais de *O.duckei*

III.2.5 EXTRAÇÃO POR SOXHLET

Cerca de 23,0 g do pó da planta seco foi adicionado ao cartucho extrator do aparelho de Soxhlet e extraído com 300 mL de Hexano durante 3 h. Após esse período, o extrato hexânico (1,5%) foi coletado e o material resultante foi extraído com CH_2Cl_2 por mais 3 h, obtendo-se o extrato diclorometano (1,5%). Ambos os extratos foram analisados por CLAE quanto a seus perfis cromatográficos.

III.2.6 EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

A extração por ultrassom foi avaliada sob várias condições experimentais (Tabela 5, p.80). Nos experimentos, 5g do EEB foram suspensos em 25 mL de ácido acético a 10% (concentração de 20%). Para a concentração de 10% do extrato utilizou-se 5 g para 50 mL da solução de ácido acético. Submeteu-se à extração por ultrassom, em equipamento Bransonic, modelo 1510-MT, variando-se os tempos de extração em 15 e 30 min. Em seguida procedeu-se às mesmas etapas descritas no Esquema 5, p.79. Outro parâmetro variável foi o número de extrações (1 ou 2) com a solução de ácido acético. Os experimentos foram realizados em duplicata para comparação do rendimento médio de iangambina e epi-iangambina extraída. A comparações dos teores foi feita com base no método cromatográfico validado e aplicado na quantificação (Capítulo V).

Tabela 5 - Parâmetros avaliados no processo de extração por ultrassom

Parâmetro	-1	+1
Concentração do extrato (%)	10 %	20 %
Número de extrações	1	2
Tempo de extração	15 min	30 min

III.2.7 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Uma alíquota de 3g do sobrenadante da FLT, obtida pela marcha de lignóides foi submetida à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel 60 (MERCK -

0,063 – 0,200 mm), com eluentes hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

Foram obtidas 80 frações de 125 mL, as quais foram concentradas sob pressão reduzida, analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (R_{fs}) em 7 grupos. Cada uma das subfrações foi analisada em CLAE-DAD quanto a seus perfis cromatográficos. A subfração 14-46 mostrou conter a iangambina, após comparação dos R_{fs} com a iangambina obtida por precipitação.

A avaliação do perfil cromatográfico das fases e frações obtidas foi feita utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) SHIMADZU-Série M10Avp, constituído de duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10Avp, módulo controlador SCL-10Avp e injetor manual, com loop de amostra de 20 μL (Rheodyne). Foi utilizada uma coluna analítica C18 da marca ACE, modelo 121-2546 de 250 x 4,6 mm, com 5 μm de tamanho de partícula. Para injeção dos extratos e fases no cromatógrafo realizou-se uma filtração prévia em filtros de seringa (Filter Pro – 13 x 0,45 μm).

O extrato etanólico bruto (EEB) foi submetido a uma análise cromatográfica em modo gradiente, utilizando MeCN (acetonitrila) e H_2O em mistura binária como sistema de eluição. A análise foi feita por injeção direta do extrato filtrado, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, variando-se a proporção de MeCN de 5 a 95%, no tempo de 0 a 60 min.

As condições cromatográficas para o estudo comparativo das fases e frações estão relacionadas na Tabela 6, p.81.

Tabela 6 – Condições cromatográficas para análise das fases e frações de *O.duckei*

Condição	Descrição
Concentração das amostras	100 $\mu\text{g/mL}$
Volume de injeção	20 μL
Fase móvel	MeCN: H_2O (50:50), isocrático
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda	215 nm
Temperatura	27 °C

III. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1 PERFIL DO EEB DE *Ocotea duckei*

O cromatograma do extrato etanólico bruto, em eluição por gradiente de solventes (Figura 21, p.82), apresentou picos majoritários em co-eluição, no tempo de 19,0 – 21,0 min; dois picos médios, em 37,0 e 39,0 min; além de picos minoritários, demonstrados na Tabela 7, p.83.

Figura 21 – Cromatogramas do EEB de *O.duckei*, em sistema gradiente de MeCN: H₂O (5 a 95%) durante 60,0 min.

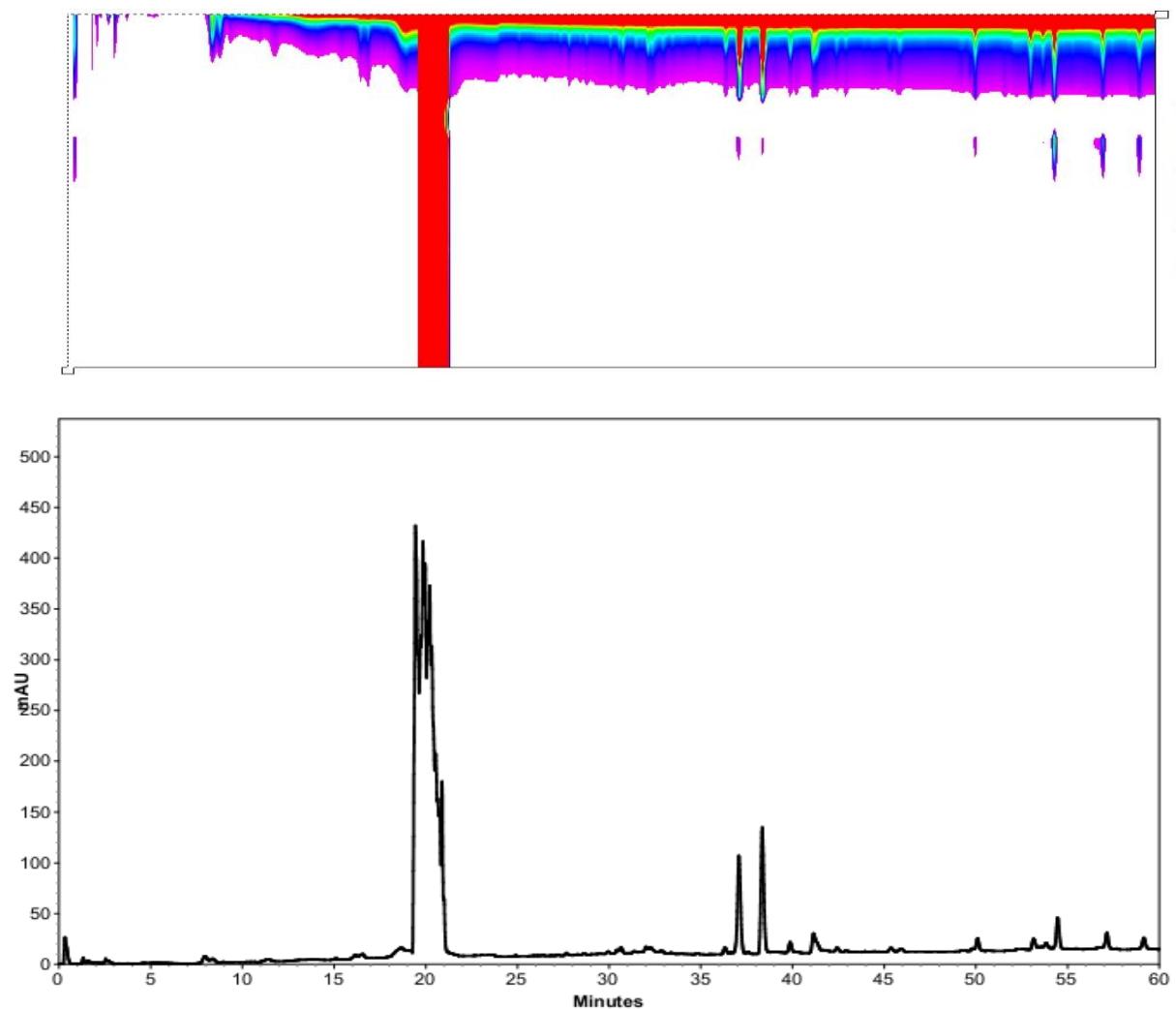


Tabela 7 – Perfil cromatográfico do EEB de *O.duckei* em sistema gradiente MeCN: H₂O (5 a 95%)

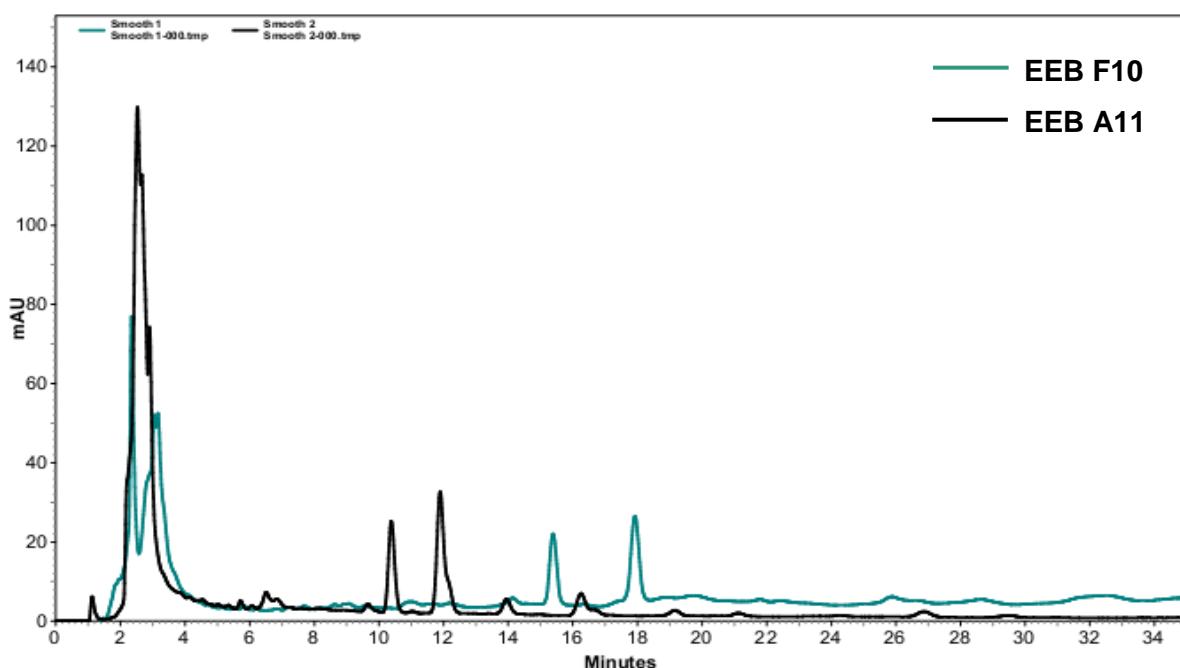
Pico #	Área percentual (%)	Tempo de Retenção (minutos)
1	0,58	7,95 – 8,36
2	0,19	11,40
3	0,42	16,14 – 16,55
4	83,60	18,65 – 20,88
5	0,32	30,64
6	0,39	32,10 – 32,26
7	0,20	36,31
8	3,54	37,07
9	4,41	38,34
10	0,34	39,87
11	1,08	41,15
12	0,54	50,08
13	0,42	53,14
14	0,22	53,82
15	1,05	54,45
16	0,69	57,14
17	0,41	59,15

É importante salientar que, nos cromatogramas, a área sobre o pico é um parâmetro que pode indicar a concentração relativa de determinado analito em uma amostra, sendo proporcional à quantidade do analito que passa pelo detector. Considerando substâncias de mesmo tempo de retenção e de mesma absorvidade molar, pode-se estimar que quanto maior a área sobre seu pico, maior sua concentração na amostra.

Os extratos das duas coletas (F10 e A11) foram comparados segundo uma mesma condição de análise em relação às áreas dos picos dos constituintes, principalmente iangambina e epi-iangambina (Figura 22, p.84). As principais diferenças encontradas estão na área relativa dos constituintes com tempo de retenção 2,0 a 4,0 min, os quais se apresentam mais concentrados no extrato A11.

Para identificação dos marcadores na matriz vegetal, comparou-se os tempos de retenção e perfil UV com o cromatograma das substâncias isoladas (subfração 14-46, cap.IV, p.105. Observou-se que a iangambina e epi-iangambina apresentaram variações em seus tempos de retenção: 10,37 e 11,88 minutos (F10); e 15,30 e 17,83 minutos (A11), o que poderia ser atribuído à interferência de outros picos na matriz vegetal e oscilações na corrida cromatográfica (condicionamento da coluna, proporção da fase móvel). Também houve uma variação expressiva nos áreas relativas dos epímeros nos dois extratos, sugerindo-se que as concentrações destes lignóides na planta podem sofrer algumas variações ao longo do ano, um fato que deve ser atentado para a prospecção de produtos naturais de modo padronizado. Além disso, ressalta-se a importância de estudos que possibilitem a obtenção do material vegetal do modo mais homogêneo possível, objetivando um extrato bruto também homogêneo. Foi visto que as duas coletas, sob o mesmo processo extractivo e com rendimentos semelhantes (aprox. 16%), apresentaram variações significantes no teor de determinados constituintes.

Figura 22 – Cromatogramas dos EEB de *O.duckei* de duas coletas diferentes (F10 e A11), na concentração de 100 µg/mL e sistema de eluição MeCN:H₂O (50:50).

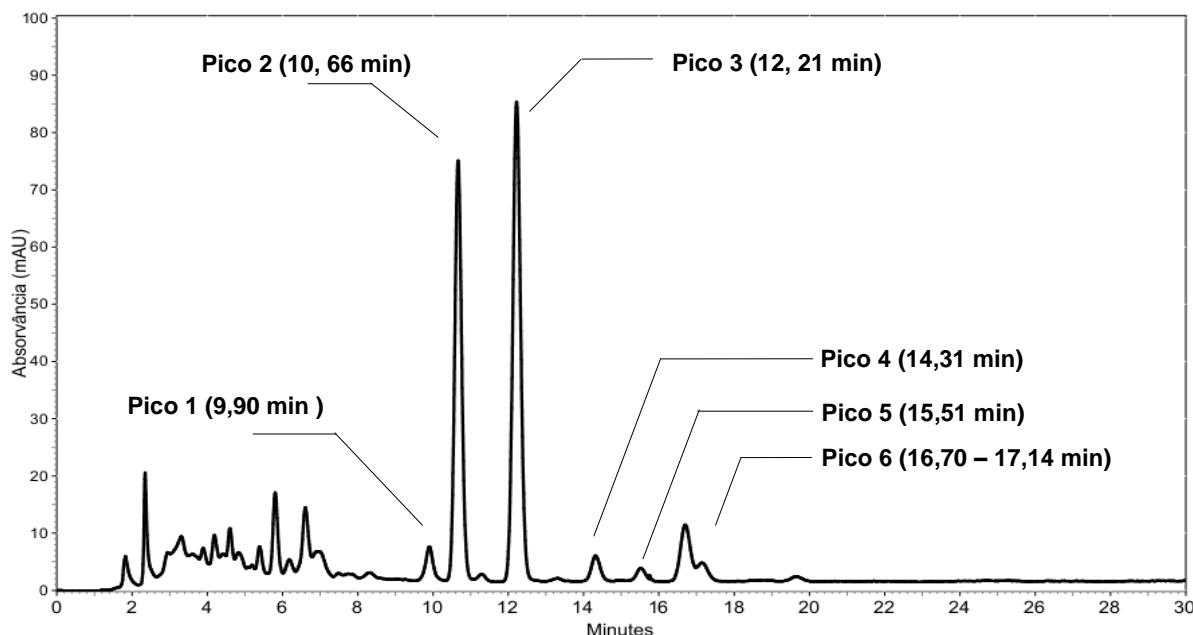


III.3.2 MARCHA DE ISOLAMENTO DE LIGNÓIDES

A fração de lignóides totais apresentou rendimento de 3,0% (6,0 g) e a iangambina precipitada, 0,22% (448,2 mg), em relação à massa de extrato bruto utilizada (200,0 g). Segundo descrito por Barbosa-Filho et. al (1999) a iangambina precipitada apresentou um rendimento de 0,06%, sendo este relativo ao total da planta coletada (5 kg); não há informações da quantidade do extrato utilizado na marcha. O precipitado, codificado como FLT-IAN, foi reservado e o sobrenadante da FLT foi concentrado para injeção no cromatógrafo (Figura 23, p.85).

Após análise cromatográfica, a FLT obtida pela marcha de isolamento de lignoides apresentou as maiores áreas dos picos de iangambina e epi-iangambina, bem como de outros lignóides, quando comparados às extrações líquido-líquido e Soxhlet (Tabelas 8 e 9, p.87-89).

Figura 23 – Cromatograma do sobrenadante da FLT de *O.duckei*, obtida pela marcha de lignóides

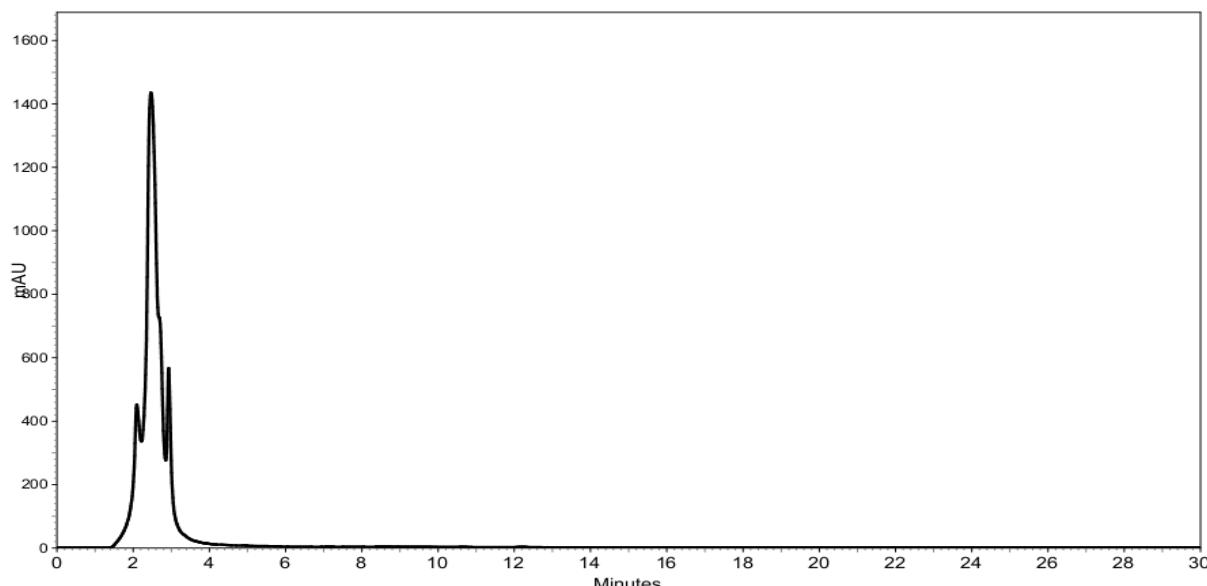


No chromatograma acima, os picos 2 e 3 representam a iangambina e epi-iangambina, lignóides majoritários em *O.duckei*, confirmado pelas injeções anteriores dessas substâncias, isoladas como precipitado (FLT-IAN). Isto evidencia uma precipitação parcial, restando-se certa quantidade dos marcadores no sobrenadante. Além destes foi possível observar, na faixa de 2 a 8 minutos, picos

não resolutos, em co-eluição; mais três picos (1,4,5), com tempos de retenção de 9,90; 14,31; 15,51 minutos; além de outro pico co-eluído em 16,70 – 17,14 minutos.

Para avaliar se a extração dos marcadores foi completa para a fração de lignóides totais, o extrato aquoso acético desengordurado foi injetado no cromatógrafo (Figura 24, p.86), verificando-se a ausência dos picos da iangambina e epi-iangambina. Isto sugere a eficiência da marcha de lignóides na extração dos marcadores para a fase orgânica (FLT).

Figura 24 - Cromatograma do extrato aquoso acético desengordurado, da marcha de lignóides de *O.duckei*.



III.3.2 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os cromatogramas das fases obtidas por ELL e Soxhlet foram comparados com a FLT, da marcha de lignóides, sob as mesmas condições cromatográficas, de modo a avaliar os teores de iangambina e epi-iangambina presentes em cada uma das fases.

As fases hexânica e diclorometano da extração líquido-líquido apresentaram perfis semelhantes e as principais diferenças são relacionadas à concentração dos constituintes na fase. A fase diclorometano apresentou picos com maiores áreas, incluindo iangambina (IAN) e epi-iangambina (EPI-IAN), em 10,14 e 11,57 minutos, respectivamente. Destaca-se o pico com tempo de retenção entre 18,0 e 19,0 min, pouco intenso na fase hexânica. Esta, por sua vez, apresentou um pico em 14,64

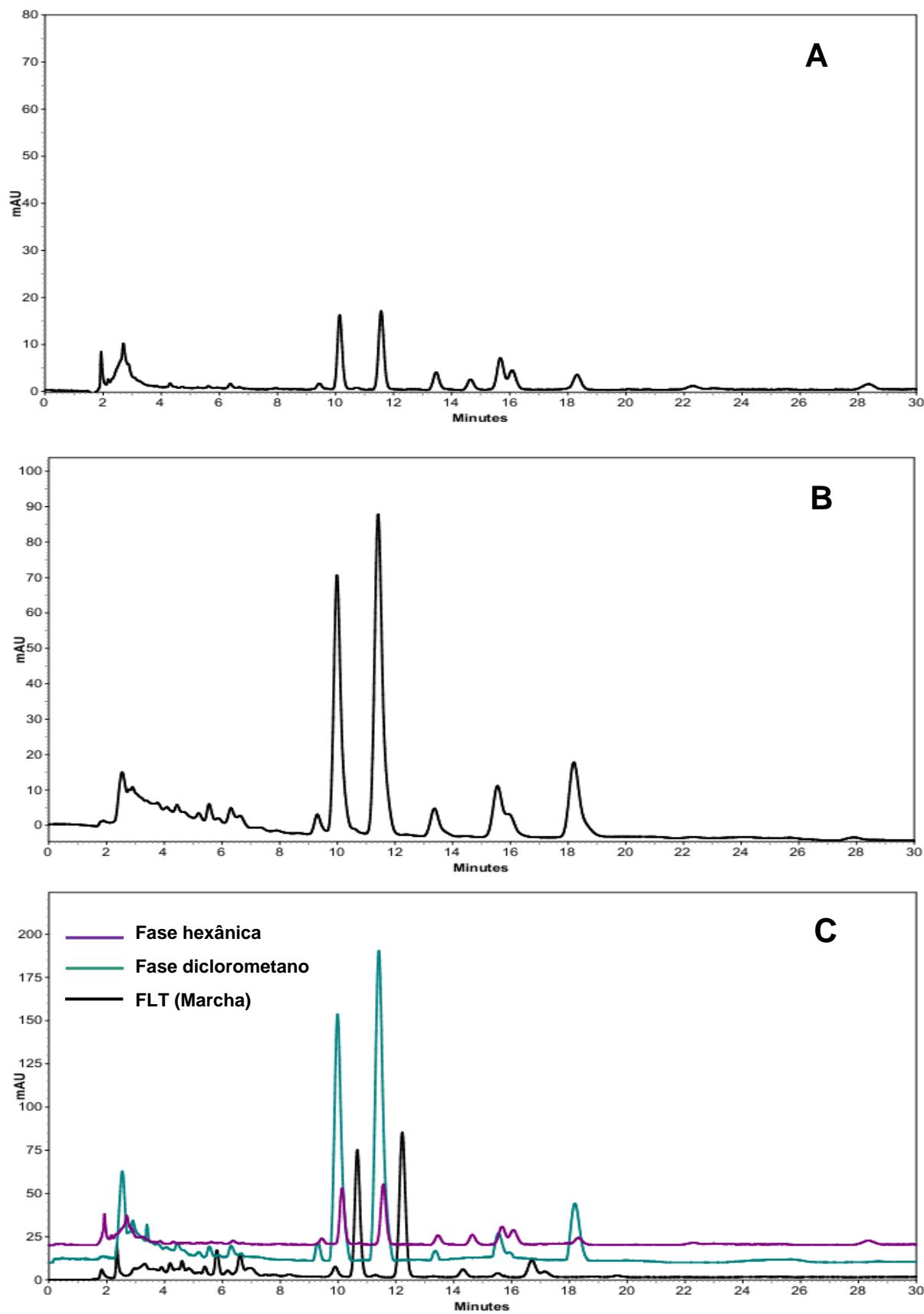
min, não observado na fase diclorometano. As duas fases apresentaram perfil similar à FLT, com tempos de retenção ligeiramente menores. A tabela 8 abaixo mostra as áreas dos picos da iangambina e epi-iangambina na fase hexânica, diclorometano e FLT.

Tabela 8 – Valores das áreas dos picos IAN e EPI-IAN nas fases hexânica, diclorometano (ELL) e FLT (marcha de lignóides).

Área		
Fase	Pico 2 (IAN)	Pico 3 (EPI-IAN)
FLT	423.845	571.274
Hex. (ELL)	81.884	101.757
CH ₂ Cl ₂ (ELL)	326.621	410.835

Foi observado que, ao somarem-se os valores de área da fase hexânica e diclorometano, obtem-se 408.505 (IAN) e 512.274 (EPI-IAN), valores bem próximos aos encontrados para a FLT. A isso, sugere-se que na extração líquido-líquido os lignóides majoritários iangambina e epi-iangambina se particionam entre as fases hexânica e diclorometano, ou seja, não há uma seletividade adequada para esses analitos. O mesmo não ocorreu com a FLT, da marcha de lignóides, a qual permitiu que os dois lignóides estivessem concentrados em sua maioria em apenas uma fase orgânica, demonstrando seletividade para essas lignanas no método de extração.

Figura 25 - Cromatogramas das fases de *O.duckei* obtidas por ELL. (A) Fase hexânica; (B) Fase diclorometano; (C) Comparação das extrações ELL x Marcha de lignóides (FLT)



Os perfis cromatográficos das fases hexânica e diclorometano da extração por Soxhlet (Figura 26, p.90) apresentaram-se muito similares, levando a crer num processo extractivo mais homogêneo que a extração líquido-líquido, embora o tempo total de extração (6h) não compense esse fato. Comparada à fase hexânica, a fase diclorometano apresentou maior área total dos picos, com maiores teores de IAN e EPI-IAN (Tabela 9, p.89). Em comparação com a FLT, as duas fases apresentaram os marcadores em menor tempo de retenção.

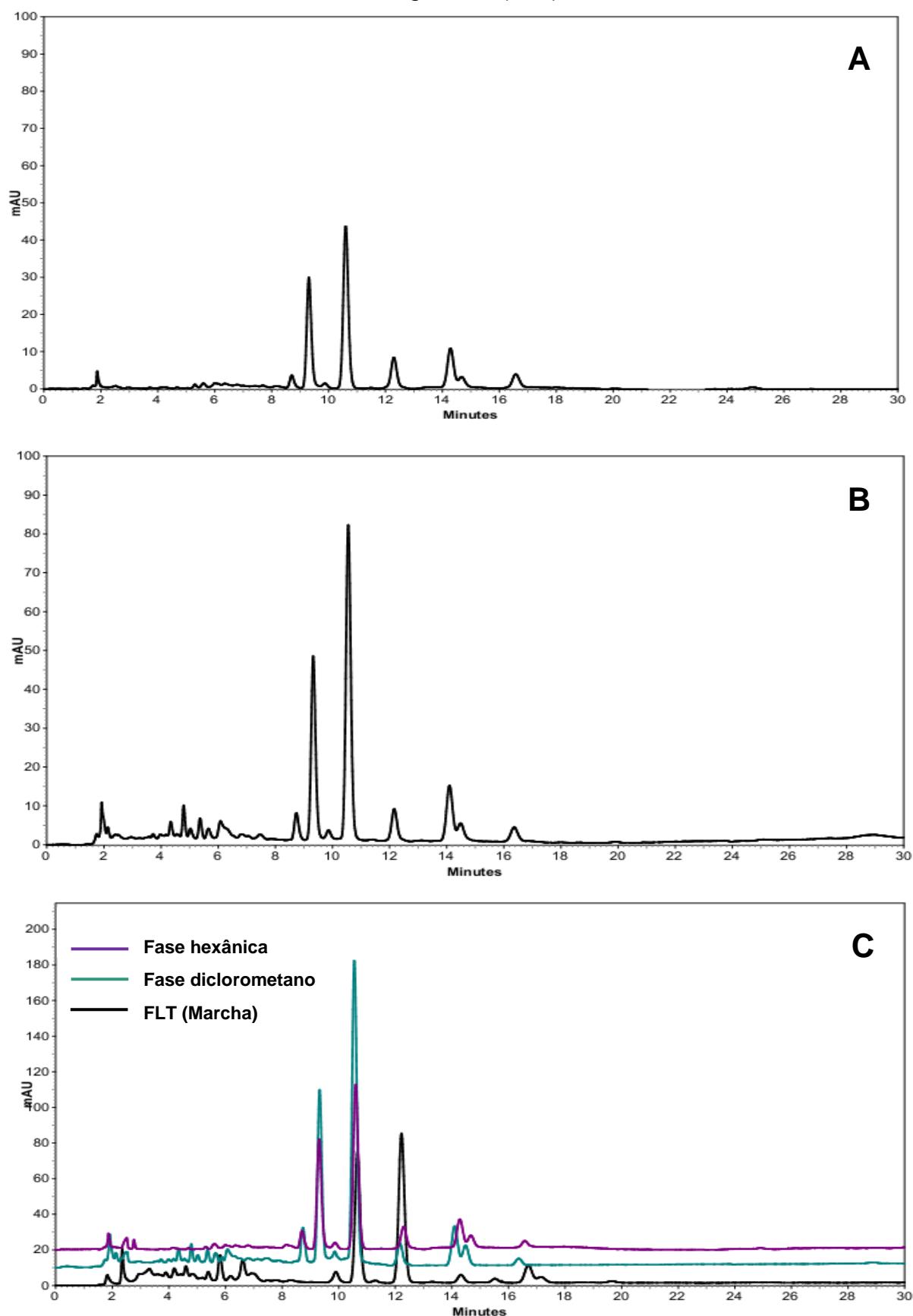
Tabela 9 - Valores das áreas dos picos IAN e EPI-IAN nas fases hexânica, diclorometano (Soxhlet) e FLT (marcha de lignóides).

Área		
Fase	Pico 2 (IAN)	Pico 3 (EPI-IAN)
FLT	432.787	584.625
Hex.	153.596	255.116
CH ₂ Cl ₂	230.679	450.570

A FLT apresentou maior área total relativa aos marcadores que as fases hexânica e diclorometano combinadas, confirmando a seletividade da marcha de lignóides em comparação com outras técnicas de extração.

A extração por ultrassom apresentou os melhores rendimentos para extração das lignanas, sendo submetida ao método da marcha dos lignóides para obtenção da FLT. A condição que ofereceu os melhores teores de iangambina e epi-iangambina foi utilizando o extrato na concentração de 20% (em relação ao volume de ácido acético), em uma extração, no tempo de 15 minutos. Essas condições possibilitaram um teor médio das lignanas de 43,68% em relação à FLT, um valor bem mais expressivo que o obtido pelo uso do agitador mecânico para extração, o qual apresentou teor de apenas 35,0% com tempo de extração de 1h. Em um estudo de otimização dos métodos de extração, Kaur et al. (2009) observaram que a extração utilizando o ultrassom forneceu os maiores teores de ginkolídeos e bilobalídeo, de *Ginkgo biloba*, com teores cerca de 2,1 vezes maiores que a extração por Soxhlet; 1,3 vezes maior por percolação e 1,5 vezes maior que a extração pressurizada. Assim, demonstra-se a grande aplicabilidade do ultrassom na extração de produtos naturais de forma eficiente.

Figura 26 - Cromatogramas das fases de *O.duckei* obtidas por Soxhlet. (A) Fase hexânica; (B) Fase diclorometano; (C) Comparação das extrações Soxhlet x Marcha de lignóides (FLT)



Capítulo IV

**Desenvolvimento do método cromatográfico,
Isolamento e Caracterização**

IV.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

IV.1.1 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2009). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária arrastando consigo os diversos componentes da mistura. De maneira mais completa, a técnica se baseia no princípio da adsorção seletiva (PERES, 2002). As diferenças no grau de migração dependerão das características físico-químicas da fase móvel, da fase estacionária e também dos analitos (NASCIMENTO, 2004).

A invenção da técnica é atribuída ao russo Mikhael Tswett, no início do século XX, o qual foi capaz de separar pigmentos coloridos em extratos de folhas verdes, utilizando um tubo preenchido com carbonato de cálcio, daí o termo “cromatografia” ser utilizado para descrever o fenômeno responsável pelo movimento das zonas coloridas dentro do tubo de vidro. Até o final da década de 60, a cromatografia líquida era praticada, com pequenas modificações, de modo similar àquela proposta por Tswett. A partir da década de 70, várias modificações foram introduzidas nesta área, surgindo-se o termo cromatografia líquida moderna (LANÇAS, 2009).

IV.1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

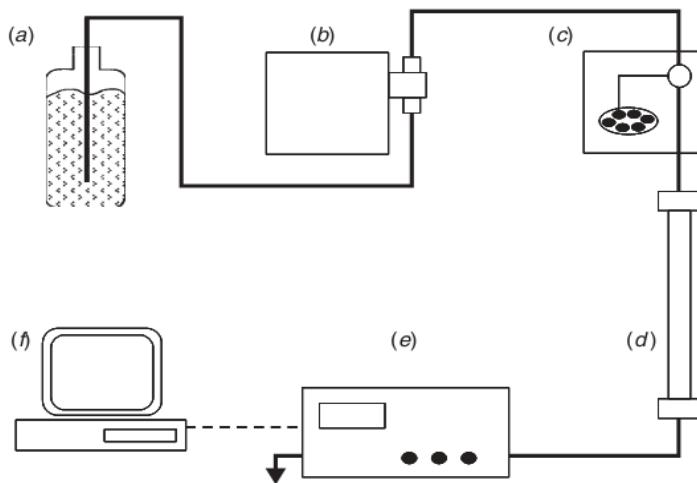
IV.1.2.1 CONCEITO, APLICAÇÕES E OPERAÇÃO

Dentre essas modificações que ocorreram a partir da década de 70, a cromatografia adquiriu seu grau de automação. Foram implementados computadores para o monitoramento dos parâmetros experimentais, além do uso de tecnologias mais sofisticadas, como o emprego de fases estacionárias mais eficientes e bombas para líquidos de alta pressão, o que contribuiu para o surgimento de uma nova técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) (LANÇAS, 2009).

A CLAE possibilita um aumento na eficiência geral do processo cromatográfico, promovendo separações mais rápidas, com maior precisão e reproduzibilidade nos ensaios, além da grande flexibilidade, podendo ser utilizada para análises qualitativas e quantitativas e acoplada a outras técnicas, como espectrometria de massas (CLAE-EM), ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN), dentre outras (SNYDER et. al., 2010). Atualmente, é uma das principais técnicas utilizadas para a separação eficiente de amostras biológicas, análises de fármacos e medicamentos, além de sua aplicação na fitoquímica, na separação e quantificação de marcadores fitoquímicos em extratos vegetais.

O sistema para operação da CLAE, o cromatógrafo, possui os seguintes componentes básicos: reservatório de solventes, bomba, injetor, coluna, detector, sistema de aquisição de dados e controlador do sistema, conforme demonstrado na Figura 27, p. 94 (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). A amostra é injetada pelo injetor do equipamento e transferida para a coluna, “arrastada” pelo fluxo de fase móvel. Este é continuamente bombeado pela coluna, onde ocorre a separação cromatográfica pelas diferenças de afinidade de cada analito com a fase estacionária/fase móvel. Os componentes separados são continuamente registrados pelo detector ao saírem da coluna. O sinal resultante do detector em função do tempo resulta no cromatograma da amostra (SNYDER et. al., 2010).

Figura 27 - Esquema básico de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). (a) Reservatório da fase móvel; (b) Bomba; (c) autoinjetor ou injetor manual; (d) coluna; (e) detector; (f) sistema controlador (SNYDER et. al., 2010).



IV.1.2.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EM CLAE

O desenvolvimento de métodos em CLAE está relacionado ao conjunto de condições que promovem uma separação aceitável de determinada amostra. Um dos objetivos é a separação das substâncias de interesse de outras substâncias presentes na amostra, representadas graficamente nos cromatogramas na forma de picos. Uma separação satisfatória deve permitir a distinção entre esses picos, ou seja, possuir uma resolução (R_s) adequada entre eles ($R_s \geq 2$). Antes de iniciar o desenvolvimento do método, deve-se atentar para os seguintes fatores: natureza da amostra e objetivo da separação; pré-tratamento da amostra; seleção do modo de eluição (gradiente ou isocrático); seleção do detector; escolha das condições de separação; identificação de problemas potenciais. Esses fatores exercem influência no método desenvolvido e, em alguns casos, uma boa separação é alcançada com poucos experimentos, enquanto que outros exigem maior complexidade (SNYDER et. al., 2010).

A natureza química da amostra é um fator importante para a escolha das condições iniciais do método. Antes da injeção, certas amostras requerem passar por um pré-tratamento (*clean-up*), de modo a remover impurezas que podem danificar a coluna e interferir na separação adequada do analito, uma tarefa muitas vezes laboriosa, envolvendo múltiplas etapas. De acordo com o tipo de amostra também deve-se considerar o tipo de detector utilizado. O detector de ultravioleta

(UV) é comumente utilizado, visto que a maioria dos componentes contém pelo menos um cromóforo adequado e são sensíveis à detecção no UV.

As condições de separação podem ser analisadas sistematicamente: Primeiramente, varia-se a fase orgânica (% B) de modo a alcançar a faixa de retenção desejada do analito. Geralmente, inicia-se com uma fase móvel de força eluotrópica elevada, reduzindo-se a proporção da fase orgânica para alcançar seletividade e resolução adequada dos picos. Por último, variam-se as condições da coluna, como comprimento, tamanho de partícula, além do fluxo da fase móvel (SNYDER et. al., 2010). Deve-se ter em mente que cada corrida cromatográfica deve fornecer informações que possibilitem racionalizar a próxima corrida e assim determinar as condições otimizadas de análise. O método desenvolvido dificilmente apresentará as melhores condições para a amostra, entretanto, deve atender às exigências definidas pelo analista e estar de acordo com os objetivos determinados para o método final.

IV.1.2.3 CLAE SEMI-PREPARETIVA

A utilização da CLAE em escala semi-preparativa (prep-CL) tem como objetivo a recuperação de um ou mais componentes purificados de uma mistura. Evidentemente, o volume em massa injetado no cromatógrafo é maior, para a recuperação dos componentes na ordem de miligramas, o que pode causar saturação da coluna e detector. Isto pode afetar o tempo de retenção, diminuição da resolução, alargamento e deformação dos picos, além de co-eluição de impurezas com o pico de interesse. Assim, deve-se tomar os devidos cuidados na transposição de uma escala analítica para a semi-preparativa (*scale-up*) (SNYDER et. al., 2010).

A principal alteração na escala semi-preparativa é em relação ao diâmetro da coluna. A coluna analítica convencional possui diâmetro de 4,6mm e suporta não mais que 1,0 - 2,0 mg em massa. Para recuperação de quantidades de até 100,0 mg pode-se utilizar uma coluna semi-preparativa de 10 mm. Na transposição de escala, o comprimento da coluna e tamanho de partícula deve permanecer o mesmo, aumentando-se o fluxo e volume da amostra em uma razão definida, proporcional à área interna da coluna, de modo a obter as mesmas condições de separação obtidas na escala analítica.

Um fato importante a ser observado é o tempo decorrido entre a detecção da amostra e sua chegada no recipiente coletor, pois, nesse tempo, ela percorre o tubo de saída com certo comprimento. Nesse sentido, faz-se necessário levar em conta esse “*delay*” de modo a evitar erros na coleta, como perda da amostra e contaminações com impurezas adjacentes. Além disso, em escala semi-preparativa, os tubos do sistema devem ser trocados por outros de diâmetro maior (até 0,020 in), de modo a balancear o aumento da pressão do sistema causado pelo aumento do fluxo da fase móvel. Outras alterações para a escala semi-preparativa estão relacionadas à célula de fluxo e necessidade de utilização de bombas mais robustas (SNYDER et. al., 2010).

IV.1.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE LIGNANAS

Esta seção descreve alguns estudos cromatográficos realizados com lignanas. Através da CLAE, algumas lignanas lipofílicas presentes em espécies de *Podophyllum* foram analisadas em colunas de sílica de fase normal. Sete diastereoisômeros da podofilotoxina foram separados com sucesso, utilizando o sistema n-heptano-diclorometano-metanol (90:10:4) como fase móvel (LIM; AYRES, 1983). Posteriormente, Fay e Ziegler (1985) desenvolveram um método para quantificação da podofilotoxina em diferentes variedades de resina de *Podophyllum*, utilizando n-hexano–metanol–tetrahidrofurano–ácido acético (85:10:4:1) como fase móvel.

Em colunas de fase reversa, metanol ou acetonitrila têm sido extensivamente utilizados como solventes da fase móvel. Segundo Lim e Ayres (1983), para a separação de misturas contendo diastereoisômeros e derivados de grupos funcionais, são necessárias fases móveis ternárias ou quaternárias, como misturas de metanol e acetonitrila ou dimetil sulfóxido.

Em estudos com extratos vegetais, seis lignanas majoritárias em extratos de *Schisandra chinensis* foram quantificadas por CLAE-UV a 254 nm (BÁRTLOVÁ et. al., 2002). Algumas lignanas furofurânicas (sesamina, siringaresinol, epi-siringaresinol, fargesina, asarinina) foram separadas em coluna de fase reversa (C-18), utilizando eluição em gradiente e alterando para isocrática em determinados pontos, o que melhorou a resolução entre os picos (WANG et. al., 2003). As lignanas

eudesmina, magnolina, iangambina e kobusina, isoladas de várias espécies do gênero *Polygala* foram analisadas através da técnica CLAE-Thermospray-EM (BERGERON et. al., 1997). Posteriormente, com o desenvolvimento da técnica ESI (*electrospray ionization*) foi possível a análise e identificação de 15 lignanas (schisandrinas e gomisinhas) dos frutos de *Schizandra chinensis* (HE et. al., 1997). Outra aplicação através de CLAE-DAD e CLAE-ESI/EM/EM possibilitou a separação, determinação e identificação de oito pares de diastereoisômeros (epímeros) da podofilotoxina e seus ésteres na posição C-2 (ZHAO et. al., 2008). Para a iangambina e espécies do gênero *Ocotea*, há poucos relatos na literatura de separações e análise por CLAE, sendo este o primeiro estudo do tipo a ser realizado para a espécie *Ocotea duckei*.

IV. 2 PARTE EXPERIMENTAL

IV.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

IV.2.1.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O desenvolvimento do método foi realizado utilizando um cromatógrafo líquido marca Shimadzu da série 10A vp, constituído de duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A vp, módulo controlador SCL-10A vp e injetor manual provido com um loop de amostra de 20 µL (Rheodyne).

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica C18 (ACE-121-2546) com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, com pré-coluna Shimadzu Shim-pack com 4,6 mm de diâmetro interno e cinco µm de tamanho de partícula.

As amostras utilizadas para o estudo foram a subfração 14-46 (Capítulo III) e a iangambina precipitada, codificada como FLT-IAN (Capítulo III). Foram preparadas soluções-estoque das amostras a 1,0 mg/mL em acetonitrila. A partir destas, preparou-se soluções de trabalho a 100 µg/mL (100 µL da sol.estoque + 900 µL MeCN) para injeção no cromatógrafo. As condições avaliadas durante o desenvolvimento do método estão relacionadas na Tabela 10, p. 99. Em cada experimento observou-se os tempos de retenção (T_r), áreas sobre os picos (A_p) e resolução (R_s) entre eles.

Tabela 10 – Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD

Condições	Experimento
Fase móvel	MeCN (100%)
	MeCN:H ₂ O (70:30)
	MeCN:H ₂ O (50:50)
	MeCN:H ₂ O (40:60)
	H ₂ O: MeCN:MeOH (40:40:20)
	H ₂ O: MeCN:MeOH (40:30:30)
	H ₂ O: MeCN:MeOH (40:20:40)
Fluxo	1,0 mL/min
	1,2 mL/min
	1,5 mL/min

IV.2.1.3 ISOLAMENTO DOS EPÍMEROSEN CLAE-DAD SEMI-PREPARETIVA

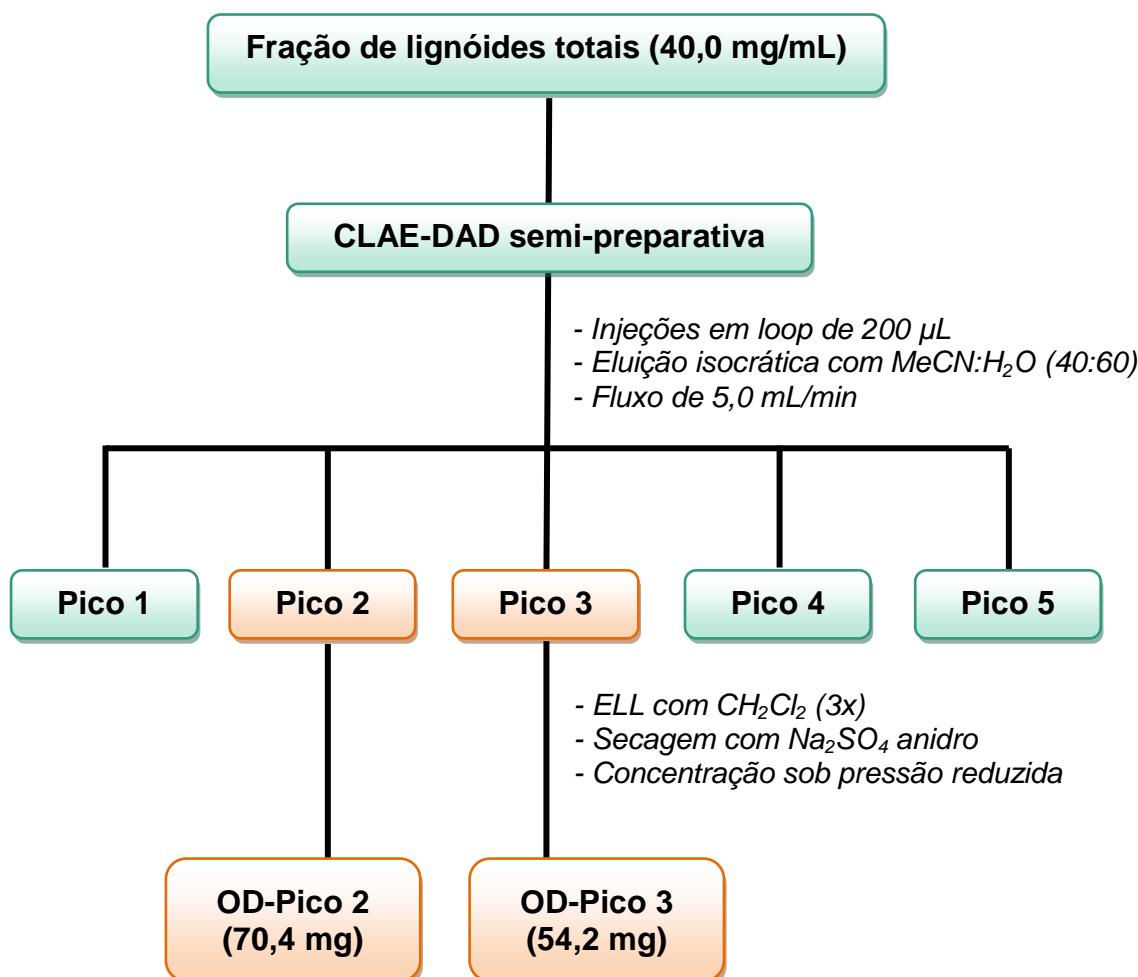
A FLT obtida da marcha de lignóides foi submetida à CLAE semi-preparativa de modo a separar a iangambina e epi-iangambina (Esquema 6, p.100). Utilizou-se o cromatógrafo líquido Shimadzu, da série 10A vp, constituído de duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A vp, módulo controlador SCL-10A vp e injetor manual provido com um loop de amostra de 200 µL (Rheodyne).

As corridas cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna semi-preparativa C18 (ACE-121-2510) com 250 mm de comprimento, 10,0 mm de diâmetro interno e 5,0 µm de tamanho de partícula, e pré-coluna ACE – C18 com 10,0 mm de diâmetro interno e 5,0 µm de tamanho de partícula.

Inicialmente, a FLT foi preparada na concentração de 5,0 mg/mL, testando-se as condições para uma concentração máxima de 40,0 mg/mL a cada injeção. As amostras foram submetidas a agitação em aparelho de Vortex (Vixar KMC-1300V), ultrasonicação por 5 min (Bransonic 1510-MT) e filtração em filtros de seringa 13 mm x 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo. As condições cromatográficas utilizadas foram: eluição isocrática, fase móvel MeCN:H₂O (40:60), fluxo de 5,0 mL/min, tempo de corrida de 35 min.

Após várias injeções subseqüentes, as frações coletadas contendo os picos referentes aos epímeros (pico 2) e (pico 3) foram submetidas a rotaevaporador para eliminar a acetonitrila da solução, restando-se uma fração aquosa. Para recuperação das substâncias da fase aquosa utilizou-se extração líquido-líquido em ampola de separação com CH_2Cl_2 (3x). Dessa forma, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obtenção das lignanas, codificadas como FLT-pico 2 e FLT-pico 3.

Esquema 6 – Obtenção da iangambina e epi-iangambina através de CLAE-DAD semi preparativa



IV.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA IANGAMBINA E EP-IANGAMBINA

As duas lignanas codificadas como OD-pico 2 e OD-pico 3 foram caracterizadas do ponto de vista estrutural e físico-químico, através de métodos espectroscópicos: Ultravioleta (UV-Vis), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) e Espectrometria de massas (EM); Experimentos de rotação ótica e dicroísmo circular; métodos termoanalíticos: Termogravimetria (TG) e Análise térmica diferencial (DTA); Ponto de fusão.

IV.2.2.1 ULTRAVIOLETA (UV-VIS) E PERFIL DE PUREZA CROMATOGRÁFICO

O espectro UV das substâncias foram obtidos em análise no cromatógrafo líquido acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD), em análise de 190 a 400 nm. Foram preparadas soluções de trabalho a 100 µg/mL em acetonitrila e injetadas no cromatógrafo utilizando o sistema MeCN:H₂O (50:50). A pureza do pico cromatográfico referente aos dois epímeros foi avaliada utilizando-se uma ferramenta do software *ClassVp*, “Peak Profile” e outra conhecida como “Peak Purity”. Na ferramenta “peak profile”, o perfil do pico cromatográfico é comparado em diferentes comprimentos de onda, fornecendo uma idéia preliminar da pureza do pico. Já “Peak Purity” compara os espectros de ultravioleta ao longo do pico cromatográfico com o espectro no ápice do pico. Um índice de pureza de 1,0 indica um grau de pureza de 100%, e valores que se desviam de 1,0 mostram picos que coeluem com impurezas.

IV.2.2.2 INFRAVERMELHO

O espectro na região do IV (4000 a 400 cm⁻¹) foi obtido em aparelho de BOMEM FT-IR (modelo MB 100), utilizando uma pequena quantidade de amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm⁻¹.

IV.2.2.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^1H E ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espetrômetro da marca VARIAN-NMR-SYSTEM, operando a 500 e 125 MHz, do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LCMA), Núcleo de caracterização e análise (NUCAL/UFPB). As amostras para análise foram preparadas por dissolução em Clorofórmio deuterado (CDCl_3), da marca *Cambridge Isotope Laboratories*.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (dobleto), *dd* (duplo dobleto), *m* (multipleto) e *q* (quarteto).

IV.2.2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas por fragmentação de OD-pico 2 e OD-pico 3 foram obtidos em espetrômetro Ion Trap-AmazonX (Bruker), do Laboratório de Espectrometria de Massas, Núcleo de caracterização e análise (NUCAL/UFPB). As substâncias foram solubilizadas em sistema de MeCN:H₂O (1:1) e 0,1% de ácido fórmico (CHCOOH) como aditivo de ionização, sendo, em seguida, diluídas para a concentração de análise. Utilizou-se a técnica de ionização por Eletrospray, em modo de detecção positivo (ESI+).

Outros parâmetros utilizados na análise foram: voltagem de saída do capilar de 140,0 V; pressão do gás de nebulização de 8 psi, temperatura do gás de dessolvatação de 220 °C; fluxo do gás de 5,0 L/min. A detecção por Ion Trap utilizou scan de massas de 70 a 1000 m/z. Na fragmentação dos picos utilizou-se os seguintes parâmetros: fragmentation width: 4,0 m/z; fragmentation time: 40 ms.

IV.2.2.5 PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão das lignanas foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão da marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura variando de 0-350 °C, sob razão de aquecimento de 5°C/min.

IV.2.2.6 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

A análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) da iangambina e *epi*-iangambina foram realizadas em analisador térmico Shimadzu DTG-60H, em colaboração com o Laboratório de Ensaio de Materiais e Estruturas (LABEME / CT / UFPB). Em cadiños de alumínio pesou-se aproximadamente 6,8 mg da iangambina e 2,5 mg de *epi*-iangambina. As amostras foram submetidas a uma análise com razão de aquecimento de 10,0 °C/min até a temperatura de 600 °C, sob atmosfera de argônio, com fluxo de 50,0 mL/min.

IV.2.2.7 ROTAÇÃO ÓTICA E DICROÍSMO CIRCULAR

Os experimentos de rotação ótica foram feitos em um polarímetro digital JASCO X2000, no Núcleo de caracterização e análise (NUCAL/UFPB). As lignanas foram dissolvidas em CHCl₃ grau HPLC (J.T.Baker) numa concentração de 1,0 mg/mL e diluídas para a concentração de análise.

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em espectropolarímetro JASCO J-815 CD, em colaboração com o Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE – Recife – PE). Foram preparadas soluções do branco (CH₂Cl₂); e das lignanas a uma concentração de 0,1 mM, colocadas em cubeta de quartzo (10 mm) para leitura no espectropolarímetro. Os parâmetros de análise foram: fluxo de nitrogênio a 3,0 L/min; *data pitch* de 0,5 nm; scan contínuo do comprimento de onda de 200 a 600 nm, a uma velocidade de 100 nm/min; tempo de resposta de 4,0 segundos; 10 acúmulos de espectros (*data aquisition*).

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

No início do desenvolvimento cromatográfico avaliou-se a força eluotrópica do solvente orgânico acetonitrila (MeCN) e sua influência na retenção dos analitos, assim, permitindo um direcionamento no desenvolvimento do método. O cromatograma da subfração 14-46 (Figura 28a, p. 105), em eluição com MeCN 100% mostra um pico com tempo de retenção em 3,26 minutos, relativo à sobreposição dos picos da iangambina e *epi*-iangambina. A acetonitrila possui alta afinidade com os analitos, eluindo os componentes próximos ao tempo morto da coluna. Isto prejudica a resolução entre os picos e pode promover a co-eluição de impurezas junto com os analitos de interesse. A próxima etapa consistiu no aumento da proporção de H₂O, de modo a alcançar tempo de retenção, seletividade e resolução adequadas para as duas lignanas.

No cromatograma da eluição com o sistema MeCN:H₂O (70:30) observa-se que há uma maior separação dos componentes da fração, com distinção entre os dois picos dos epímeros, entretanto, ainda se encontram com resolução insatisfatória e tempos de retenção baixos (5,16 min e 5,53 min). Visto que se tratava de uma mistura de diastereoisômeros, avaliou-se o método descrito por Lim e Ayres (1983) que utilizou sistemas ternários de H₂O:MeCN:MeOH, para verificação de uma melhor separação entre os epímeros.

A figura 29, p. 106 mostra os cromatogramas obtidos com esse sistema de eluição, variando-se as proporções entre MeCN e MeOH e verificando a resolução entre os picos. O sistema H₂O:MeCN:MeOH (40:40:20) mostrou picos em 8,79 e 9,85 minutos; o sistema H₂O:MeCN:MeOH (40:30:30) apresentou picos em 10,50 e 11,86 minutos, enquanto que o sistema H₂O:MeCN:MeOH (40:20:40) exibe tempos de retenção de 11,91 e 13,50 para os epímeros. Observou-se que a adição de certa proporção de MeOH possibilita melhor resolução entre os picos (embora pouca) e aumenta os tempos de retenção dos analitos. Uma maior proporção de acetonitrila na fase orgânica reduz a resolução bem como os tempos de retenção.

No cromatograma obtido com o sistema MeCN:H₂O (50:50) (Figura 28c, p. 105) observa-se os picos com resolução adequada e tempos de retenção

satisfatórios (10,17 min e 11,65 min), em um tempo de corrida de 15 minutos. Este método foi escolhido para os estudos posteriores de validação e quantificação, visto que possibilita a análise rápida dos analitos, apresentando resolução e seletividade, livres de impurezas em co-eluição. Além disso, utiliza condições de análise simples, acessíveis e não-dispendiosas. O sistema ternário $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$, embora adequado, não promoveu um grau de separação expressivo para os analitos, que justificasse o uso de três solventes para as análises. O sistema de $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (40:60) (Figura 28d, p.105) promoveu a melhor separação entre os epímeros, contudo, o longo tempo de análise e retenção dos analitos (22,77 min e 27,23 min) contribuíram para a permanência no sistema $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50).

O aumento do fluxo para 1,2 mL/min e 1,5 mL/min foi capaz de reduzir o tempo de retenção dos epímeros, sem prejudicar a resolução/seletividade entre os picos. No entanto, preferiu-se trabalhar em condições mais brandas de análise, com fluxo de 1,0 mL/min, visto que o aumento do fluxo gera maior pressão na coluna e equipamento, o que poderia reduzir sua vida útil com análises frequentes.

Figura 28 – Cromatogramas da subfração 14-46 da FLT, obtidas durante o desenvolvimento do método.

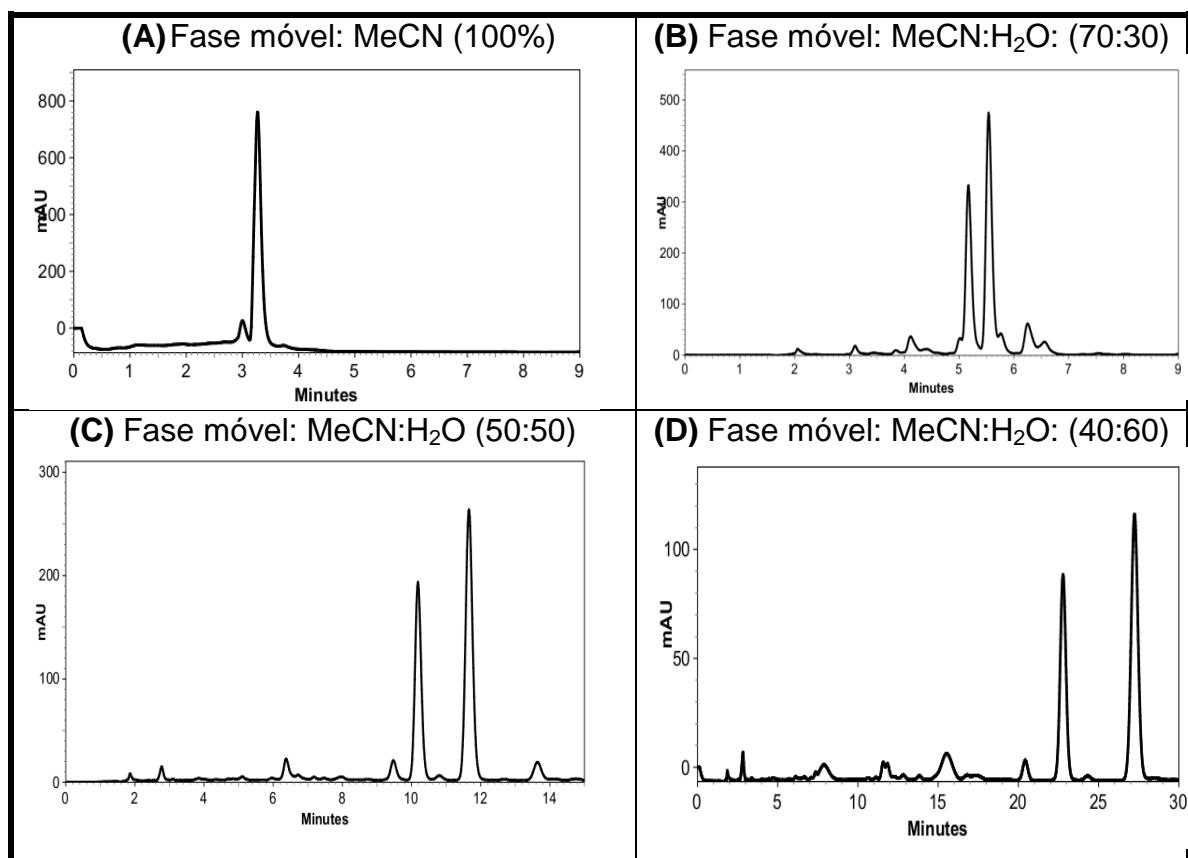
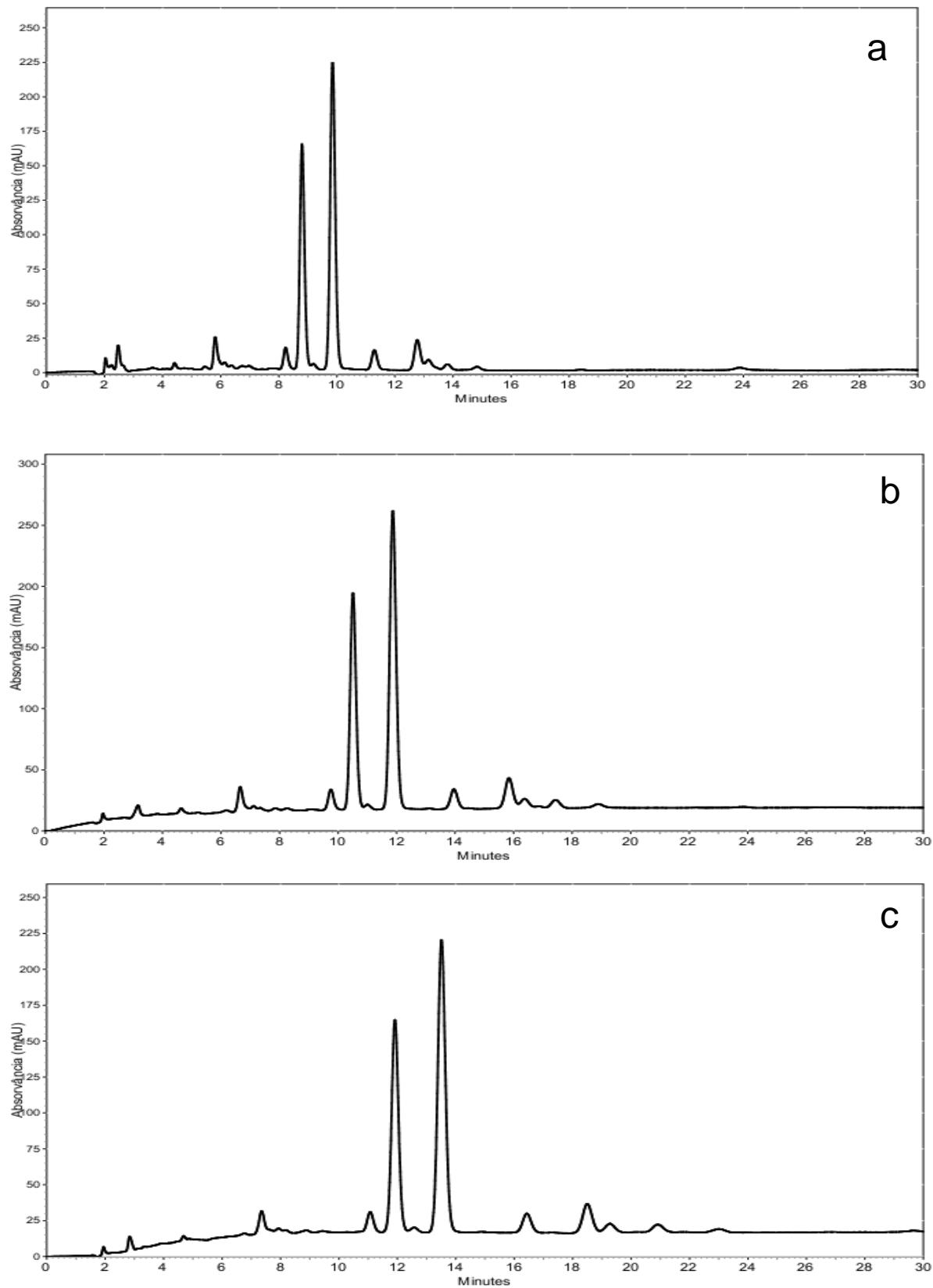


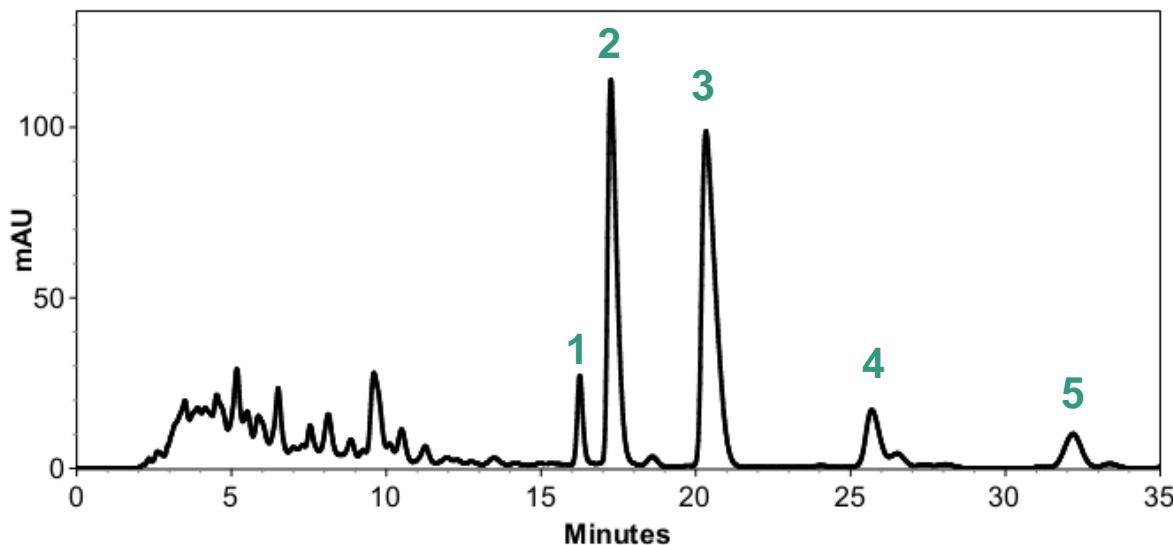
Figura 29 – Cromatogramas da subfração 14-46 da FLT. (a) Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$ (40:40:20); (b) Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$ (40:30:30); (c) Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{MeOH}$ (40:20:40)



IV.3.2. ISOLAMENTO DOS EPÍMEROS EM CLAE-DAD SEMI-PREPARATIVA

Após desenvolvimento do método na coluna analítica decidiu-se aplicar as mesmas condições para o isolamento das lignanas em coluna semi-preparativa. No entanto, os picos apareceram com tempos de retenção mais baixos (8,90 min e 10,08 min) e algumas vezes em coeluição com outros componentes da fração. Isso se deve à maior concentração da amostra na coluna, evidenciando outros picos que não apareciam nas análises em coluna analítica e que alteram a retenção dos analitos de interesse. Um aumento de 10% na proporção de H₂O (Figura 30, p. 107) no sistema possibilitou melhor separação entre os picos 2 e 3 (17,25 min e 20,32 min) e maior margem de segurança para a coleta dos picos sem impurezas. Após isolamento, a substância FLT-pico 2 se apresentou como um sólido cristalino branco-amarelado, enquanto que FLT-pico 3 apresentou-se como um sólido branco, de aspecto flocular.

Figura 30 – Cromatograma da FLT, na concentração de 40,0 mg/mL, em sistema de eluição MeCN:H₂O (40:60)



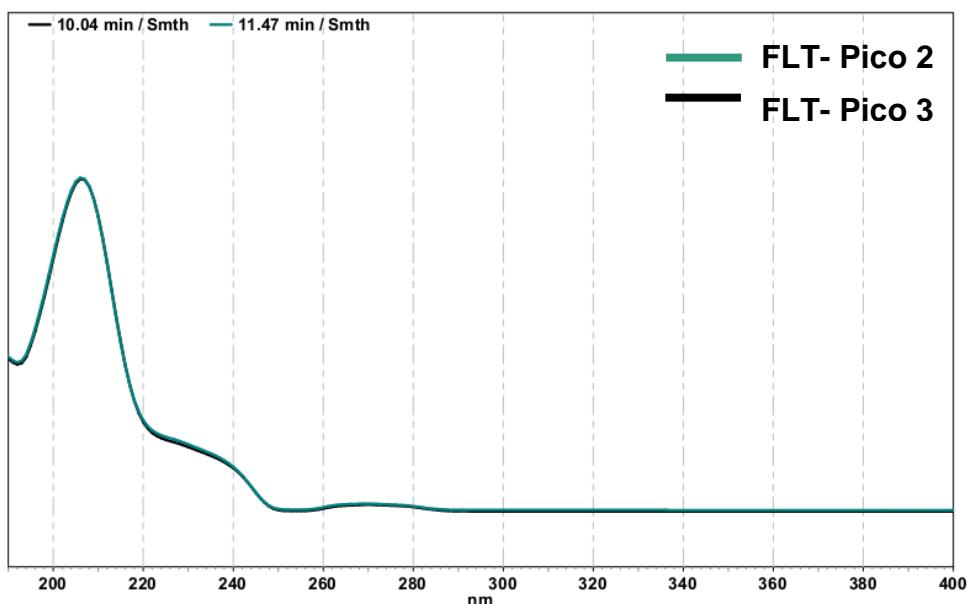
IV.3.3 CARACTERIZAÇÃO DA IANGAMBINA E *EP*-IANGAMBINA

As análises por métodos espectroscópicos, termoanalíticos, dentre outros, permitiram uma caracterização extensiva para a iangambina e seu epímero, epi-iangambina.

IV.3.3.1 ULTRAVIOLETA (UV-Vis) E PERFIL DE PUREZA CROMATOGRÁFICO

O espectro de UV-Vis dos dois epímeros apresentou-se rigorosamente idêntico, conforme demonstrado na figura 31, p.108. Destacam-se duas regiões de absorções em 205 nm e 225 nm, além de uma terceira região, fraca em 270 nm.

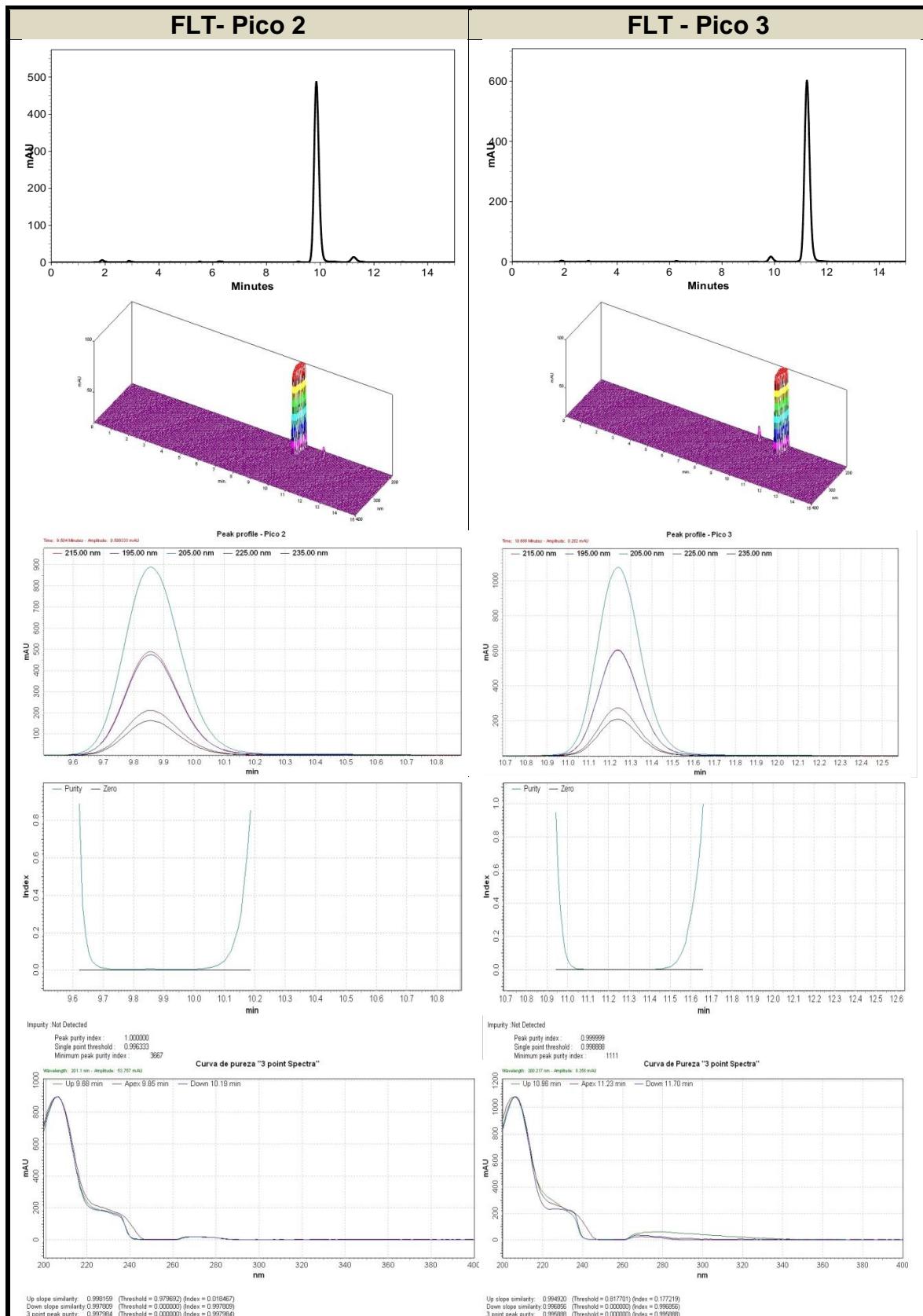
Figura 31 – Sobreposição dos espectros na região de UV/Vis (detector de arranjo de diodos) de 190 a 400 nm dos epímeros, na concentração de 100 µg/mL.



A figura 32, p.109 demonstra a avaliação do grau de pureza para as duas substâncias, após isolamento na coluna semi-preparativa. O pico 2 apresentou tempo de retenção de 9,85 minutos, índice de pureza espectroscópica de 1,000 (*Peak purity*) e índice de similaridade em três pontos (*up, apex, down*) de 0,998. A ferramenta *peak profile* mostra que o pico assume formato de gaussiana em diferentes comprimentos de onda de análise, importante para uma quantificação mais exata e precisa. Para o pico 3, observa-se um tempo de retenção de 11,23 minutos, índice de pureza espectroscópica de 0,999 e similaridade em três pontos de 0,995.

Baseado no espectro UV e na ferramenta *peak profile*, determinou-se o comprimento de onda de 215 nm para as análises de validação e quantificação, pelo fato das lignanas apresentarem máximas absorções nessa região do espectro UV.

Figura 32 – Análise do perfil de pureza em CLAE-DAD para os picos 2 e 3, na concentração de 100 µg/mL. (a) Cromatograma; (b) Cromatograma 3D; (c) Peak profile; (d) Peak purity; (e) Similaridade em três pontos

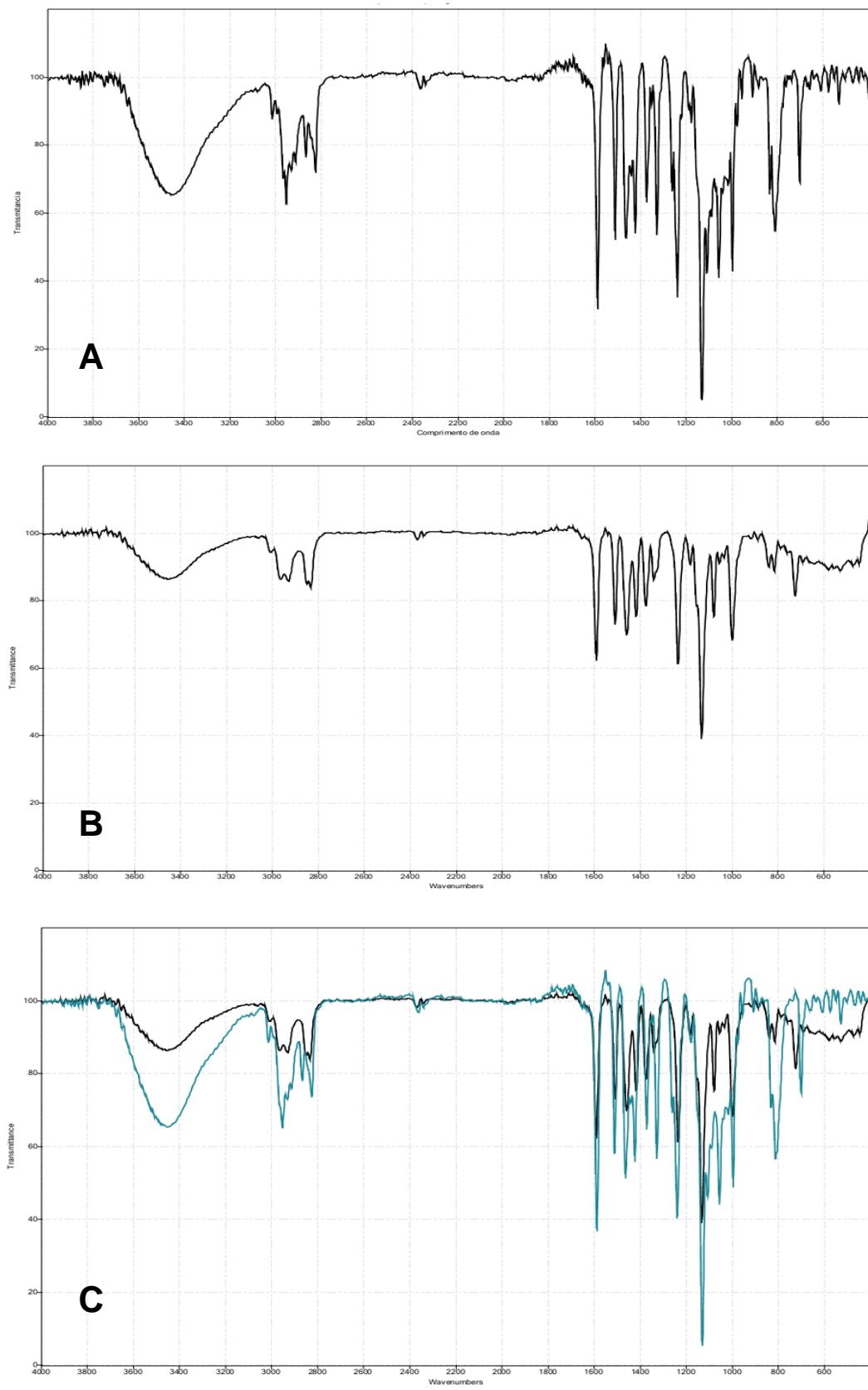


IV.3.3.2 INFRAVERMELHO (IV)

O espectro de IV das lignanas (Figura 33, p.111) mostrou absorções bem semelhantes, sendo as principais diferenças relacionadas à intensidade das absorções, mais intensas para o pico 2, e na região de *fingerprint* do espectro (700 – 400 nm).

As bandas de absorção mais características são observadas em 3450 cm^{-1} , característico de deformação de estiramento de hidroxila (-OH); 2953 e 2931 cm^{-1} , relativo à estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H das metilas (CH_3); 2866 2825 cm^{-1} , referentes à estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H, de grupos CH_2 . Nessa região também são observadas absorções das ligações C-H de grupos metoxila (O-CH_3). Em 1587 e 1464 cm^{-1} percebe-se bandas características de estiramento de ligação C=C aromática e, em 1371 cm^{-1} , banda característica de deformação angular de grupos metila. Na região de 1300 – 1000 cm^{-1} , característica da absorção de ligações C-O, observa-se uma maior intensidade dos sinais para a iangambina, com destaque para uma banda forte em 1130 cm^{-1} , atribuída a ligação C-O-C de éter dialquílico. As bandas em 1240 e 1057 cm^{-1} foram atribuídas a absorções de estiramento C-O-C de éteres alquil arílicos. Além disso, percebe-se algumas diferenças da iangambina para seu epímero na região de *fingerprint* do espectro, particularmente em 997 e 813 cm^{-1} e na faixa de 700-400 cm^{-1} (PAVIA et al., 2001).

Figura 33 - Espectros de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) dos epímeros. (a) FLT-pico 2; (b) FLT – pico 3; (c) Sobreposição dos espectros (em azul, pico 2; em preto, pico 3)



IV.3.3.3 PONTO DE FUSÃO

Realizou-se três medições do ponto de fusão das substâncias para obtenção da média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%). Os resultados estão dispostos na tabela 11 abaixo. Não houve variação muito grande nas três medições, o que sugere um alto grau de pureza para as duas substâncias.

Tabela 11 – Valores do ponto de fusão em °C para FLT-pico 2 e FLT-pico 3

	FLT – pico 2	FLT – pico 3
Replicata 1	121,6	120,3
Replicata 2	122,7	120,5
Replicata 3	121,4	119,8
Média	121,9	120,2
DP	0,57	0,29
CV%	0,47	0,24

IV.3.3.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^1H E ^{13}C

Os dados espectroscópicos das duas substâncias, após comparação com valores da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999) permitiram identificar FLT-pico 2 como sendo a **iangambina** e FLT-pico 3 como sendo a **epi-iangambina** (Tabelas 12 e 13, p. 113 e 114). A comparação com os valores da literatura permitiu o reassinalamento dos deslocamentos químicos de hidrogênio das substâncias.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) da iangambina e *epi*-iangambina em CDCl_3 e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)

C	Iangambina		Epi-iangambina	
	δ_{C}	BARBOSA-FILHO et al. (1999)	δ_{C}	BARBOSA-FILHO et al. (1999)
1	54,5	54,6	54,52	54,5
2	86,16	86,2	87,82	87,8
4	72,12	72,2	71,04	71,1
5	54,5	54,6	50,00	50,0
6	86,02	86,2	82,22	82,2
8	72,12	72,2	69,81	69,8
1'	136,85	136,9	136,75	136,9
1''	136,85	136,9	133,99	134,1
2'	102,9	103,2	102,88	103,0
2''	102,9	103,2	102,48	102,6
3'	153,56	153,7	153,40	153,4
3''	153,56	153,7	153,21	153,2
4'	137,57	137,8	137,50	137,6
4''	137,57	137,8	136,85	137,0
5'	153,56	153,7	153,40	153,4
5''	153,56	153,7	153,21	153,2
6'	102,9	103,2	102,88	103,0
6''	102,9	103,2	102,48	102,6
OCH ₃ (4')	60,96	61,0	60,88	60,8
OCH ₃ (4'')	61,04	61,0	60,88	60,8
OCH ₃ (3',5')	56,29	56,0	56,11	56,2
OCH ₃ (3'',5'')	56,36	56,0	56,17	56,2

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) da iangambina e *epi*-iangambina em CDCl_3 e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)

H	Iangambina		<i>Epi</i> -iangambina	
	δ_{H}	BARBOSA-FILHO et al (1999)	δ_{H}	BARBOSA-FILHO et al (1999)
1	3,11 (<i>m</i>)	3.11 (<i>m</i>)	2,89 (<i>q</i>)	2.89 (<i>q</i>)
2	4,73 (<i>d</i> , $J=4,0$ Hz)	4.76 (<i>d</i> , $J=4,2$ Hz)	4,40 (<i>d</i> , $J=17,5$ Hz)	4.40 (<i>d</i> , $J=7,0$ Hz)
4ax	3,92 (<i>dd</i> , $J=5,0$ e 10,0 Hz)	3.80-3.96 (<i>m</i>)	3,26 – 3,43 (<i>m</i>)	3.27-3.40 (<i>m</i>)
4eq	4,29 (<i>dd</i> , $J=5,0$ e 7,5 Hz)	4.30-4.40 (<i>m</i>)	4,12 (<i>m</i>)	3.87-3.90 (<i>m</i>)
5	3,11 (<i>m</i>)	3.11 (<i>m</i>)	2,89 (<i>q</i>)	3.27-3.40 (<i>m</i>)
6	4,73 (<i>d</i> , $J=4,0$ Hz)	4.76 (<i>d</i> , $J=4,2$ Hz)	4,82 (<i>d</i> , $J=13,0$ Hz)	4.81 (<i>d</i> , $J=5,3$ Hz)
8ax	3,92 (<i>dd</i> , $J=5,0$ e 10,0 Hz)	3.80-3.96 (<i>m</i>)	3,90 (<i>m</i>)	3.87-3.90 (<i>m</i>)
8eq	4,29 (<i>dd</i> , $J=5,0$ e 7,5 Hz)	4.30-4.40 (<i>m</i>)	4,17 (<i>m</i>)	4.27 (<i>d</i> , $J=9,5$ Hz)
2'	6,55 (<i>s</i>)	6.59 (<i>s</i>)	6,56 (<i>s</i>)	6.57 (<i>s</i>)
2''	6,55 (<i>s</i>)	6.59 (<i>s</i>)	6,57 (<i>s</i>)	6.57 (<i>s</i>)
6'	6,55 (<i>s</i>)	6.59 (<i>s</i>)	6,56 (<i>s</i>)	6.57 (<i>s</i>)
6''	6,55 (<i>s</i>)	6.59 (<i>s</i>)	6,57 (<i>s</i>)	6.57 (<i>s</i>)
OCH ₃ (4')	3,82 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,81 (<i>s</i>)	3,81 (<i>s</i>)
OCH ₃ (4'')	3,82 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,83 (<i>s</i>)	3,83 (<i>s</i>)
OCH ₃ (3')	3,85 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,85 (<i>s</i>)
OCH ₃ (3'')	3,85 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,85 (<i>s</i>)
OCH ₃ (5')	3,85 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,85 (<i>s</i>)
OCH ₃ (5'')	3,85 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	3,86 (<i>s</i>)	3,85 (<i>s</i>)

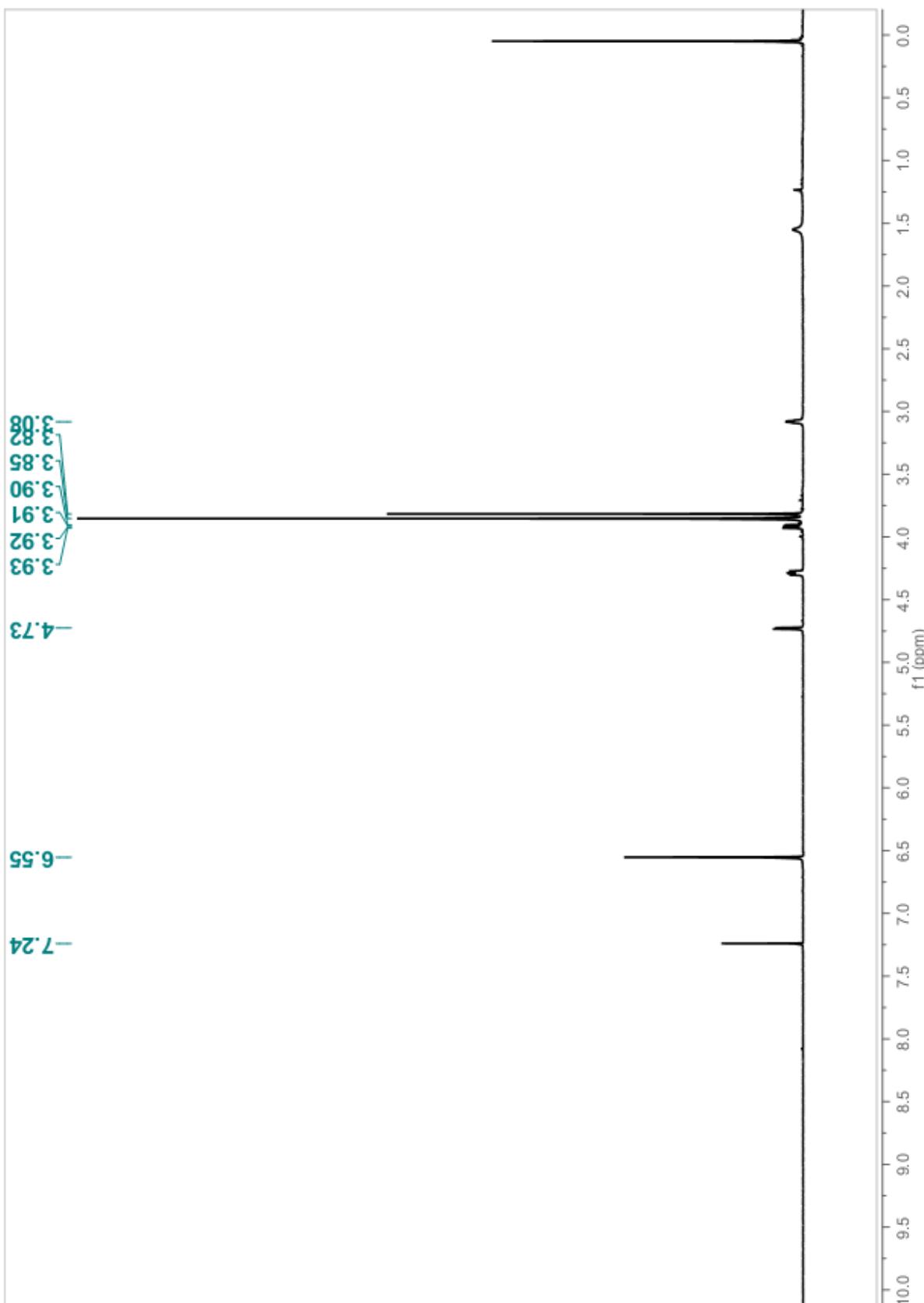
Figura 34 - Espectro de ^1H -RMN de FLT-Pico 2 (CDCl_3 , 500 MHz)

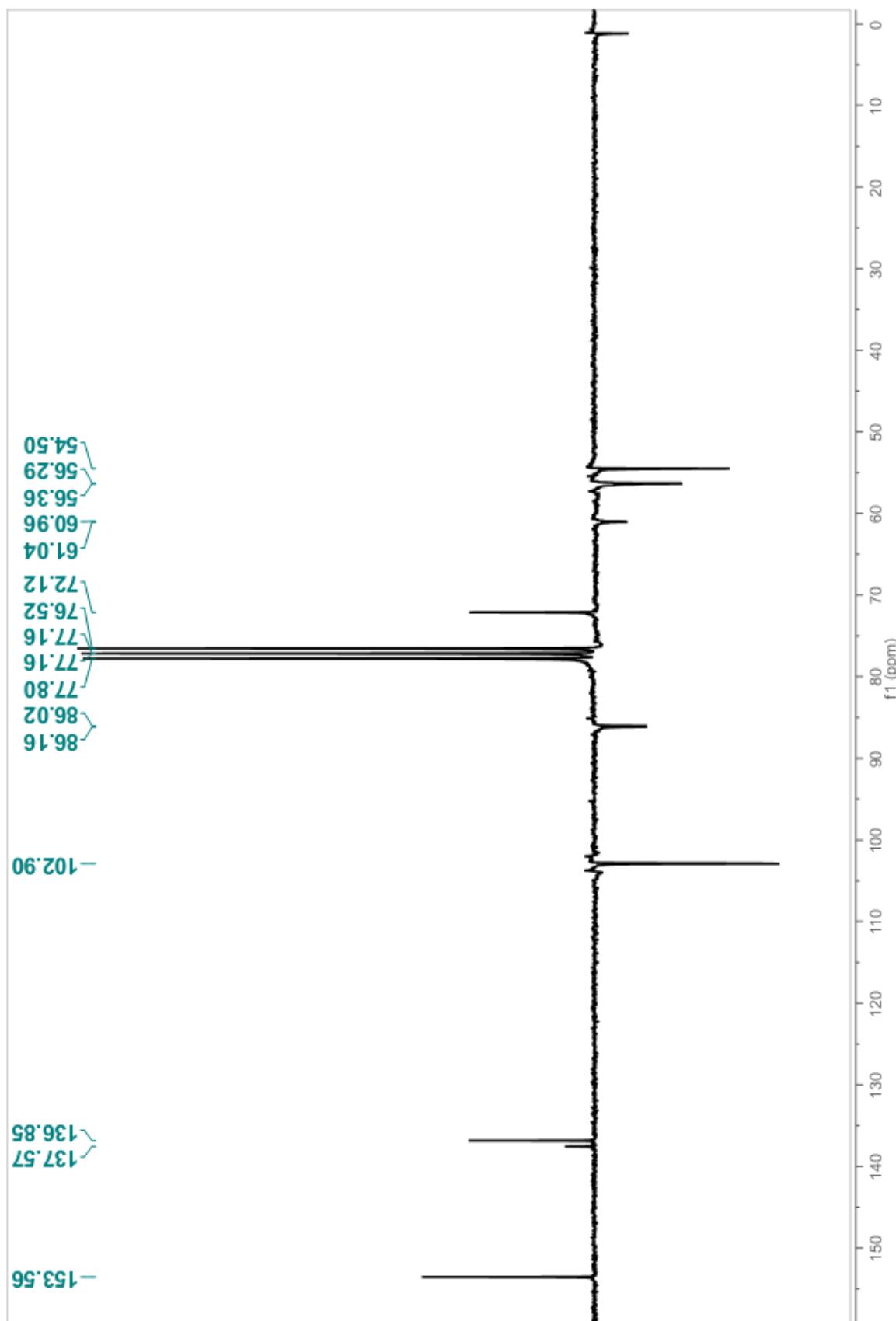
Figura 35 – Espectro de ^{13}C - RMN (APT) de FLT-Pico 2 (CDCl_3 , 125 MHz)

Figura 36 – Expansão do espectro de ^1H -RMN de FLT-Pico 2 (CDCl_3 , 500 MHz), na região de 4,8 a 3,0 ppm

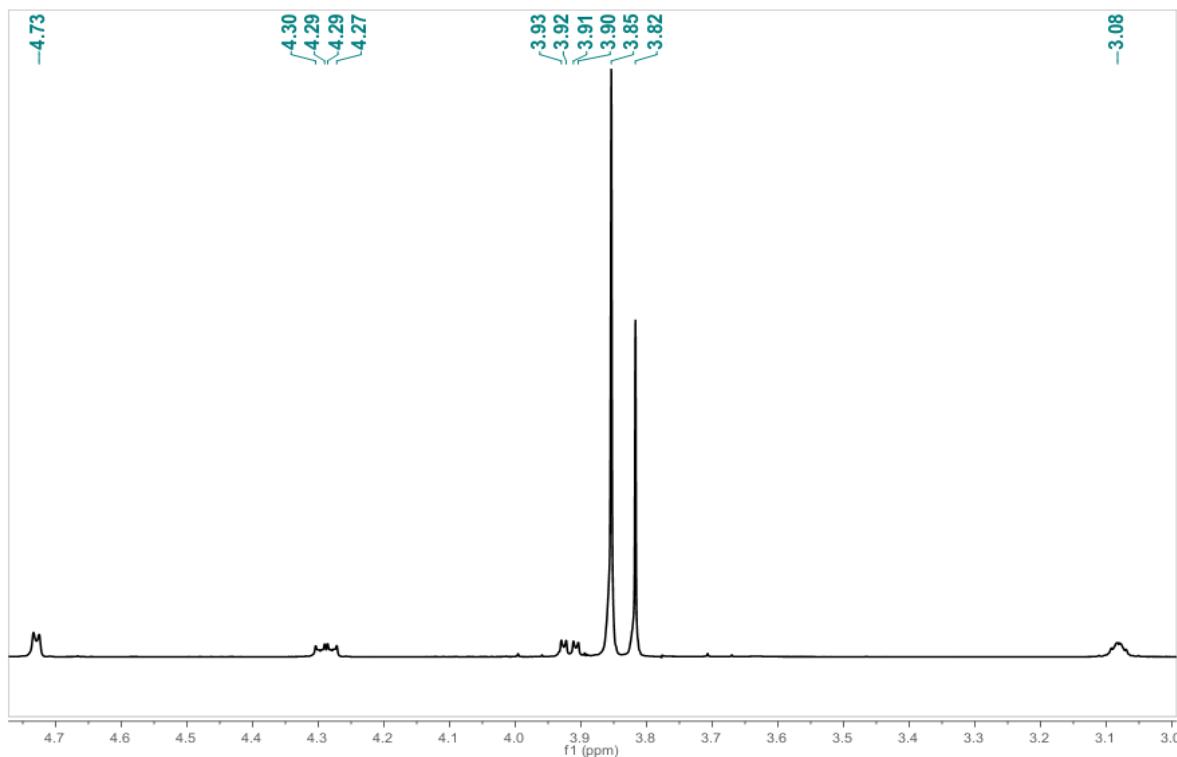


Figura 37 – Expansão do espectro de ^{13}C - RMN (APT) de FLT-Pico 2 (CDCl_3 , 125 MHz) na região de 105,0 a 50,0 ppm

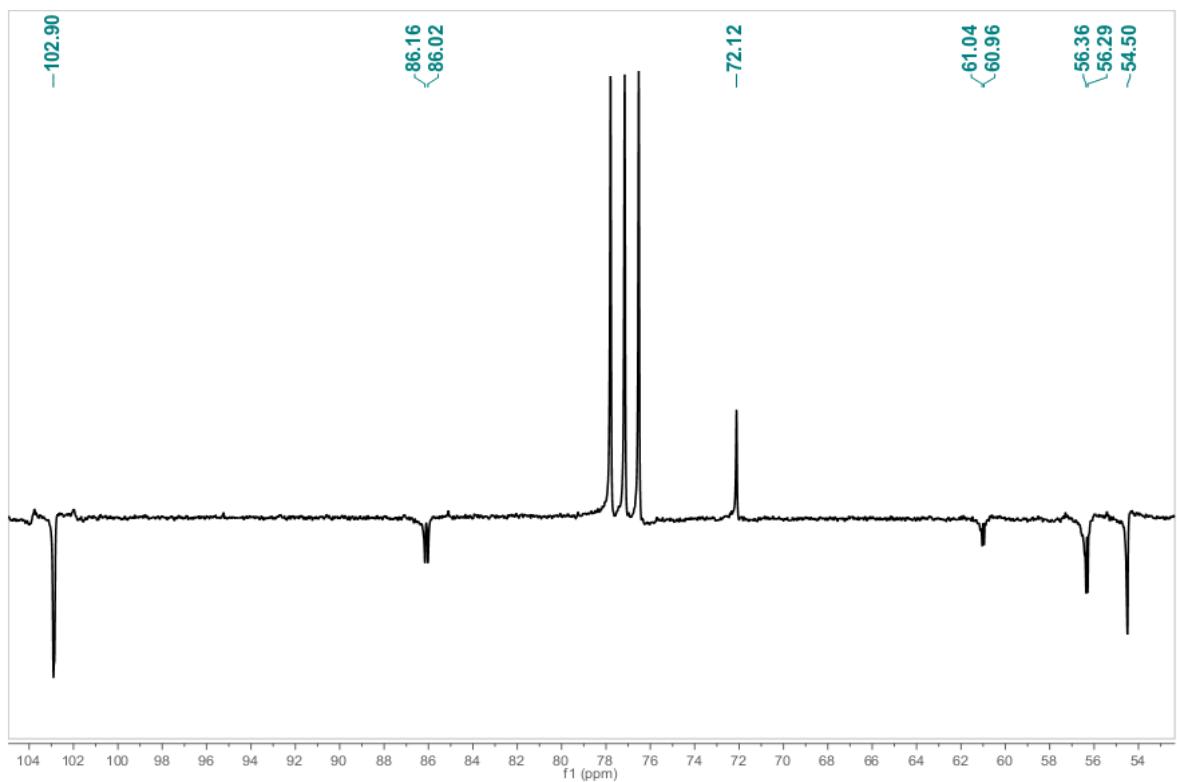


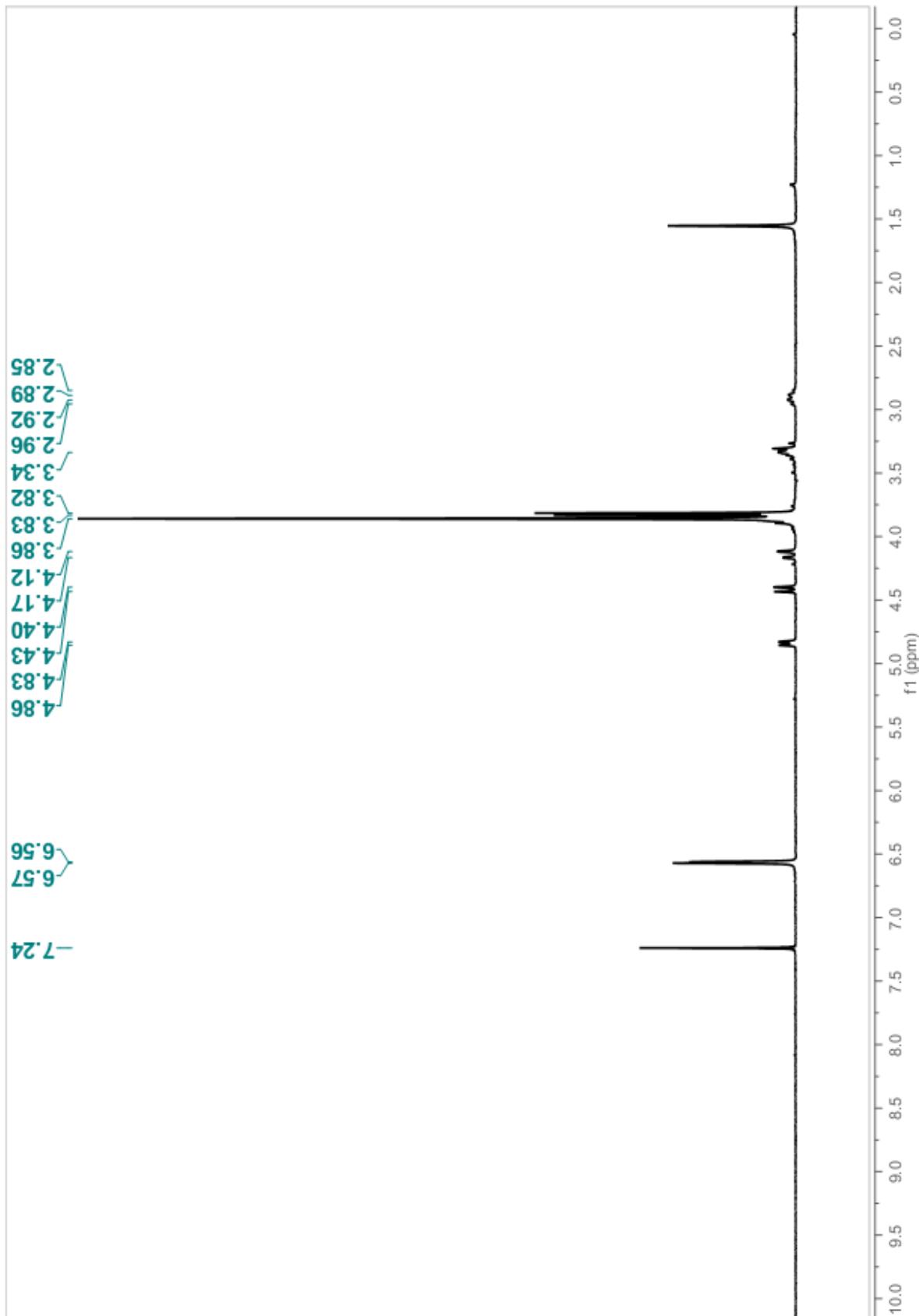
Figura 38 - Espectro de ^1H -RMN de FLT-Pico 3 (CDCl_3 , 500 MHz)

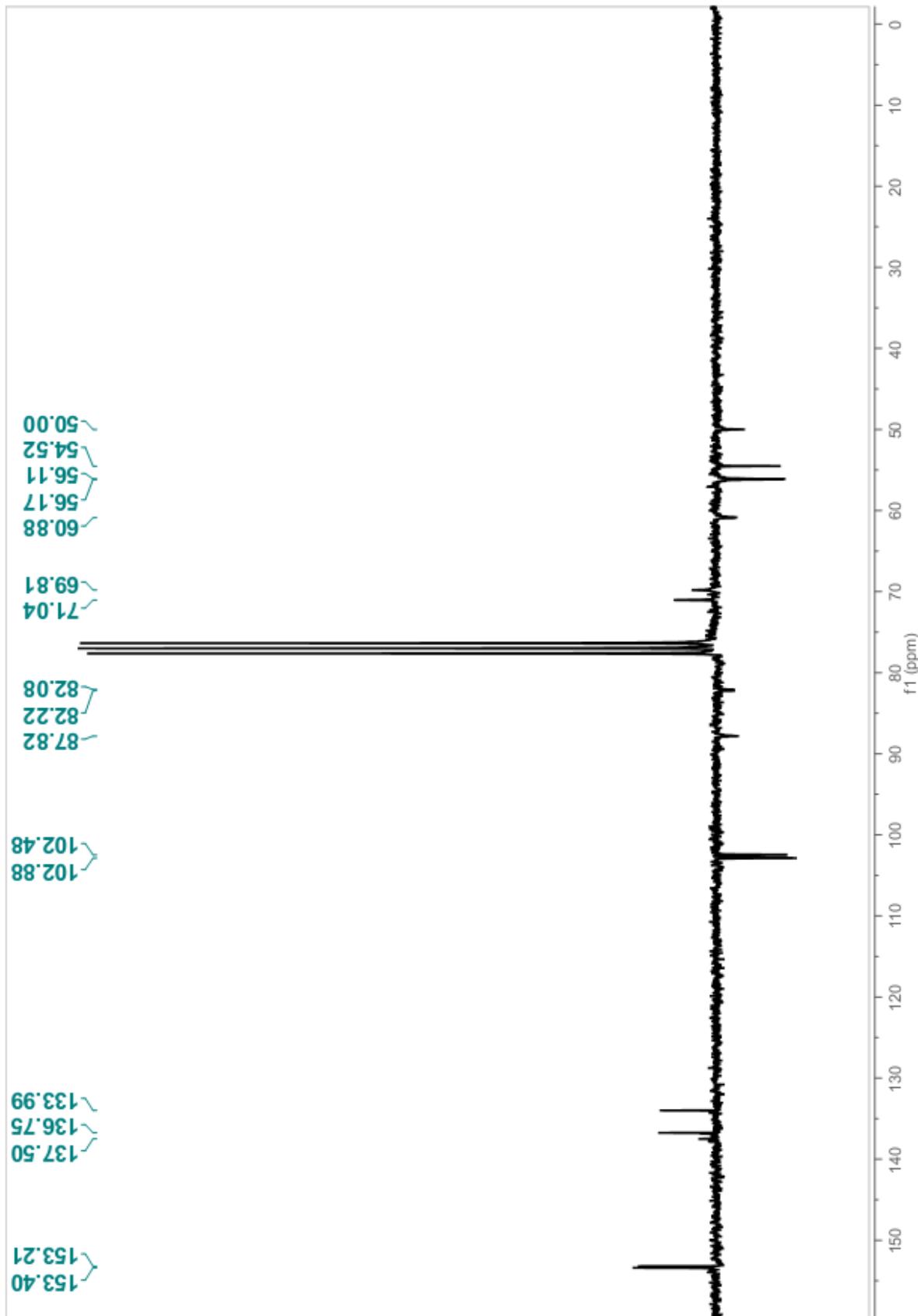
Figura 39 - Espectro de ^{13}C - RMN (APT) de FLT-Pico 3 (CDCl_3 , 125 MHz)

Figura 40 – Expansão do espectro de ^1H -RMN de FLT-Pico 3 (CDCl_3 , 500 MHz) na região de 5,0 a 2,8 ppm.

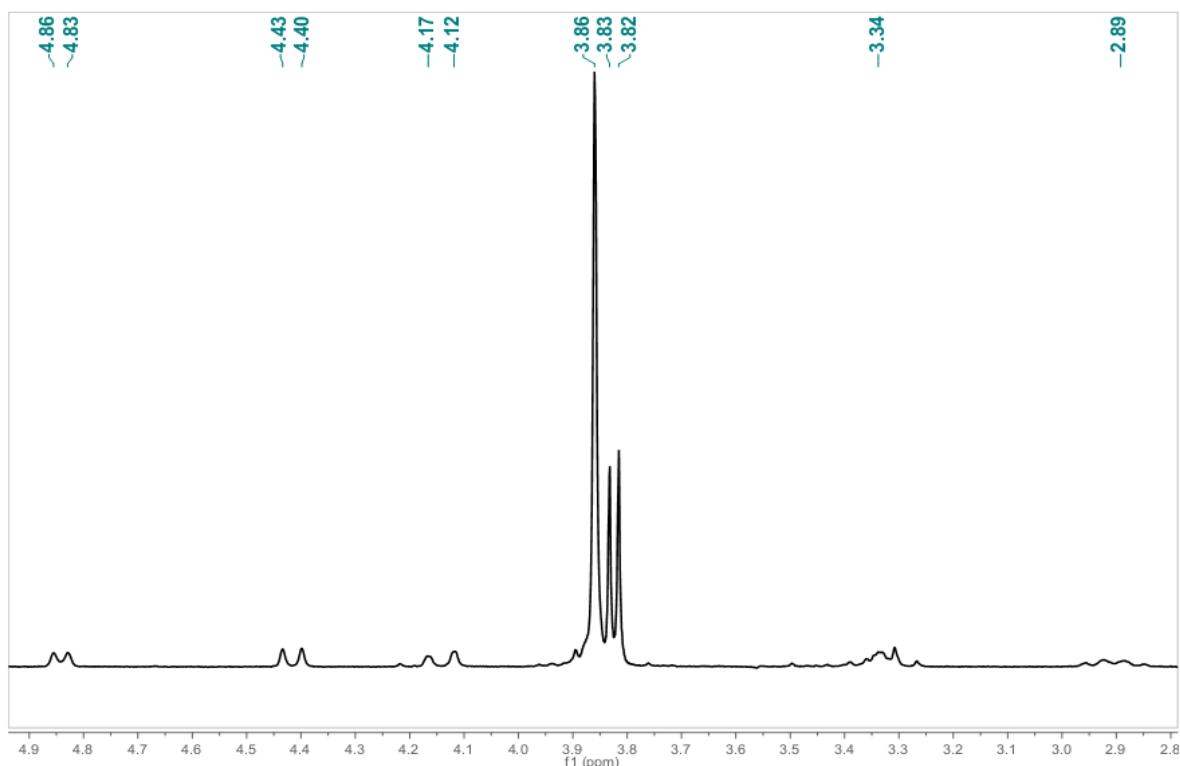
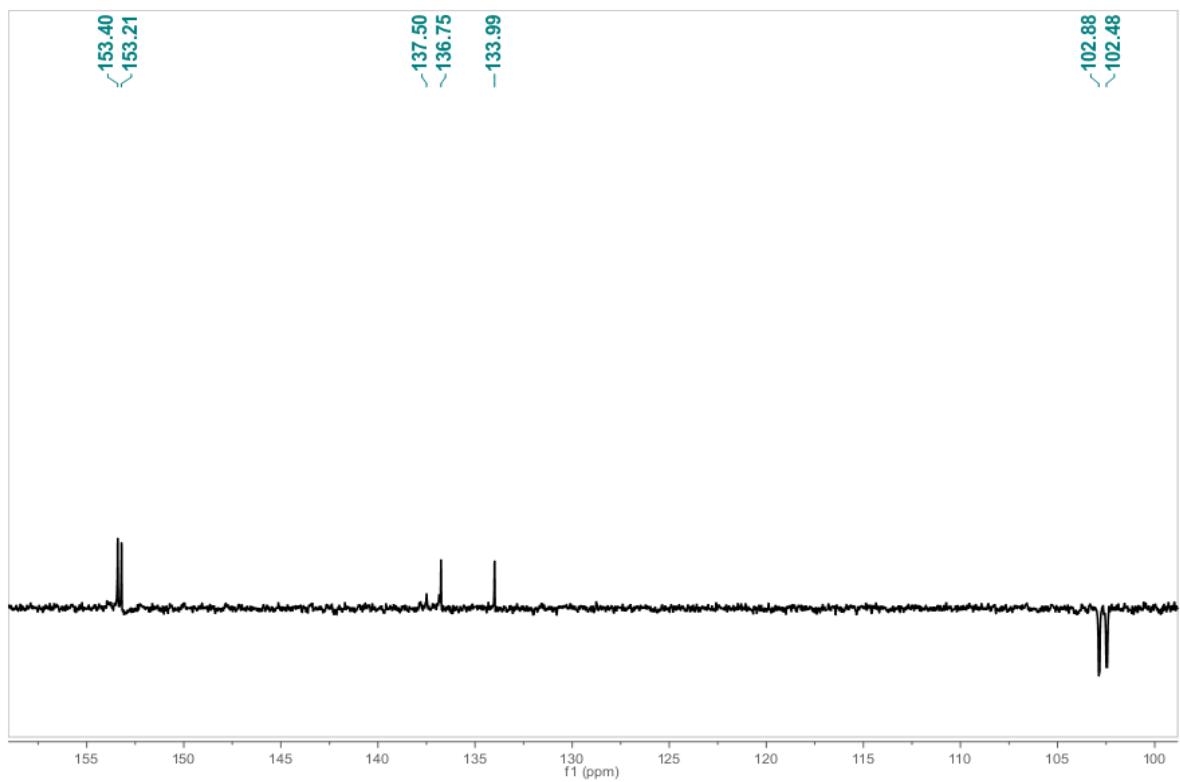


Figura 41 – Expansão do espectro de ^{13}C -RMN (APT) de FLT-Pico 3 (CDCl_3 , 125 MHz) na região de 160,0 a 100,0 ppm.



IV.3.3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectro de massas da iangambina e *epi*-iangambina ($M = 446,19$ Da, $C_{24}H_{30}O_8$), obtido pela técnica eletrospray em modo positivo (ESI+), mostrou padrões de fragmentação semelhantes, entretanto, com algumas diferenças na intensidade relativa de alguns fragmentos (Figuras 42 e 43, p. 121 e 122). Os espectros mostram um pico em 447,1 m/z, relativo à formação do íon $[M+H]^+$, característico da protonação causada pelo aditivo utilizado na técnica ESI (ácido fórmico). Observa-se um íon em 469,2 m/z, sendo este característico da formação de aduto de sódio $[M+Na]^+$ do composto.

O íon em m/z 429,1 [$M^+ - OH_2^*$] corresponde a uma perda de uma molécula de H_2O , partindo-se da molécula protonada. Pela fragmentação desse íon, observa-se o aparecimento de um pico em m/z 411,1, atribuído à perda de uma nova molécula de água (18 m/z), provavelmente relacionada ao outro anel furano do composto. Para a *epi*-iangambina, observa-se um pico em 464,2 m/z atribuído a uma perda de um fragmento de 18 m/z a partir do pico da substância desprotonada (446,1 m/z), correspondendo a saída de uma molécula de H_2O .

O fragmento observado em m/z 279,0, bastante intenso, foi atribuído à cisão heterolítica da ligação 1'- 6 ou 1''- 2, liberando o íon trimetoxi-benzeno. A fragmentação [447,1 → 279] originou picos em m/z 249 e 219, correspondente a perda de uma unidade oximetilênica (CH_2O) de 30 m/z, seguida de outra perda desse fragmento.

Figura 42 - Espectro de massas (fragmentação) da iangambina, obtido através de ionização por eletrospray, em modo positivo (ESI⁺)

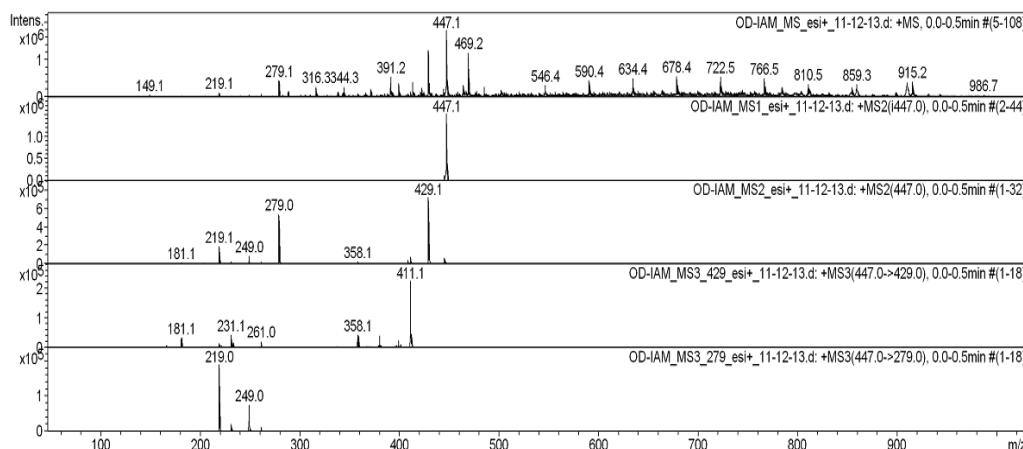
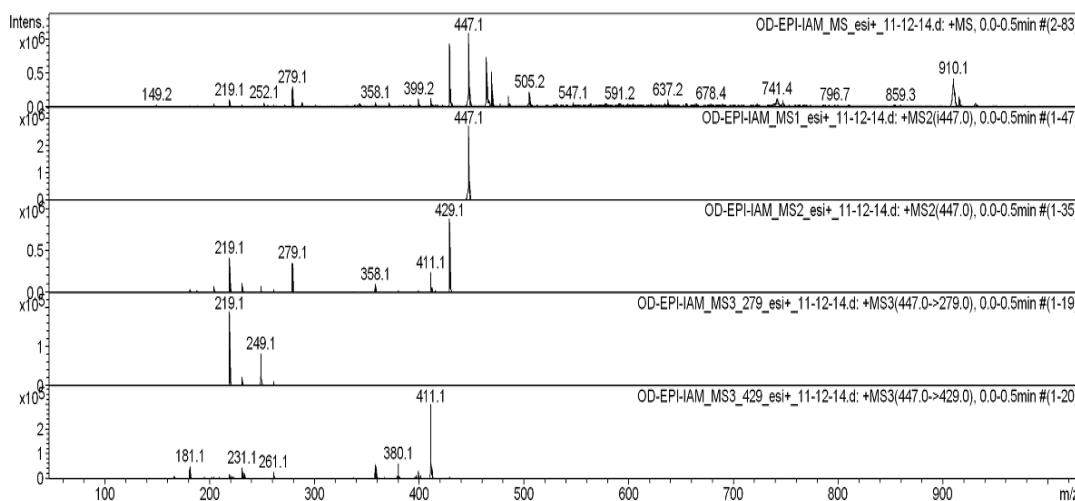
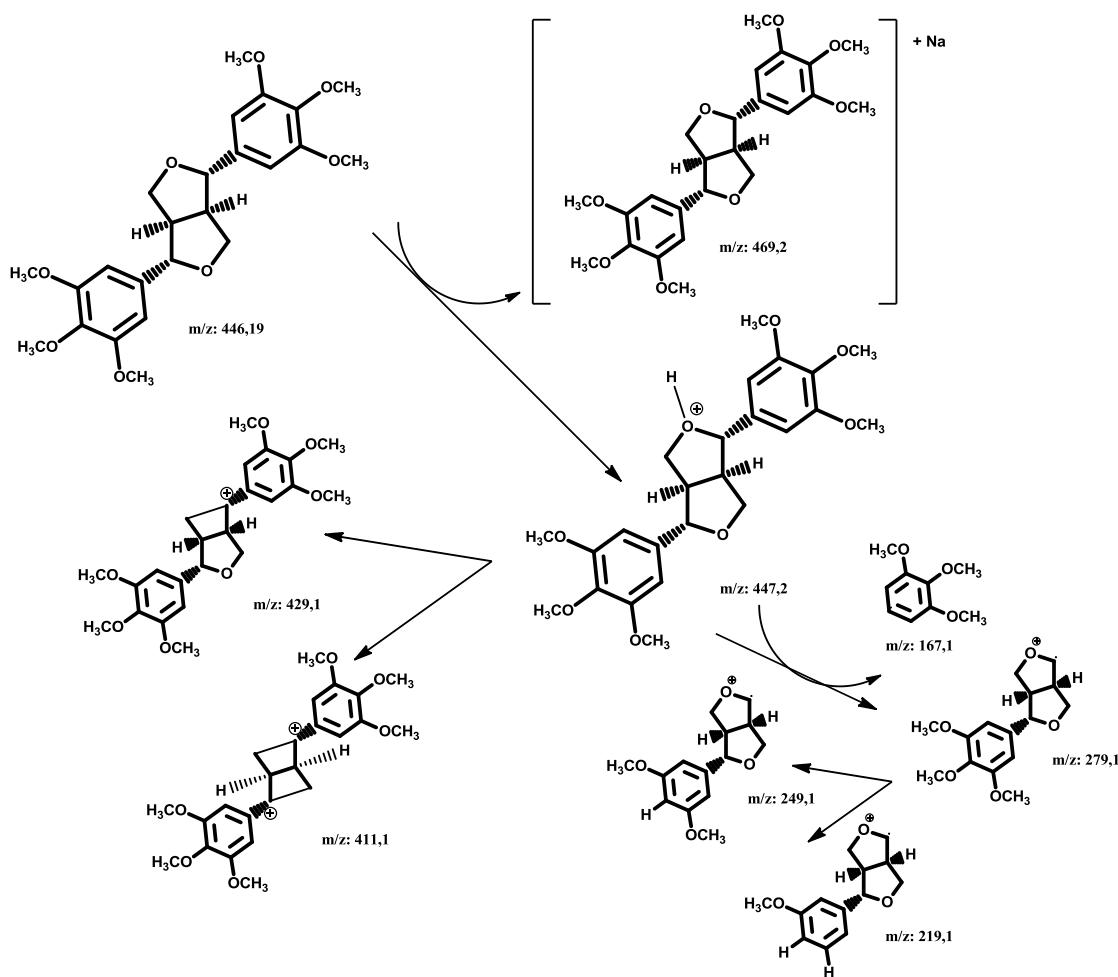


Figura 43 – Espectro de massas (fragmentação) da epi-iangambina, obtido através de ionização por eletrospray, em modo positivo (ESI^+)



Esquema 7 – Proposta de fragmentação de massas da iangambina, utilizando ionização por eletrospray em modo positivo



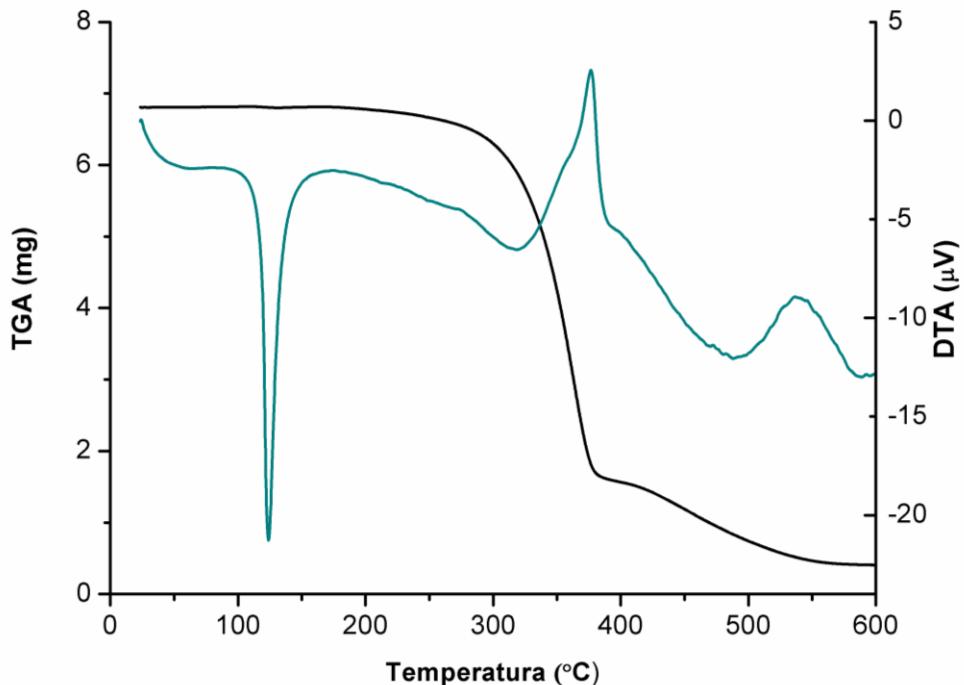
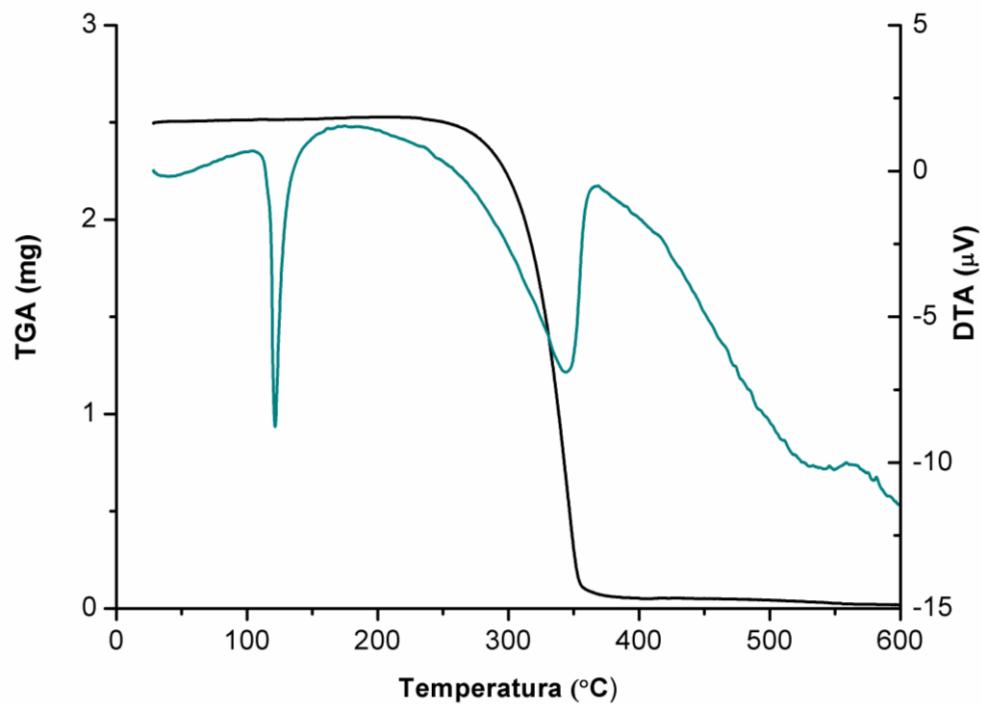
IV.3.3.6 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

As figuras 44 e 45 (p. 124) mostram os dados térmicos obtidos pela análise de TG e DTA da iangambina e *epi*-iangambina. Os gráficos demonstram, no eixo Y da esquerda, a curva termogravimétrica, a qual dispõe a perda de massa da substância em função da temperatura. No eixo y da direita se encontra a curva DTA, que relaciona a diferença de temperatura entre a substância e o material de referência, termicamente inerte. Assim, pode-se observar as variações de entalpia (ΔH) e eventos endotérmicos e/ou exotérmicos que podem ocorrer com a amostra, com o aumento da temperatura. Na DTA, os picos ascendentes caracterizam eventos exotérmicos, enquanto que os picos descendentes são atribuídos aos eventos endotérmicos. (STORPIRTIS et al., 2009)

Para a **iangambina** (Figura 44, p. 124), observa-se um processo endotérmico característico de fusão na temperatura de 123,9 °C, não se observando perda de massa na mesma faixa de temperatura. Uma primeira etapa de decomposição endotérmica é observada para na faixa de 285 a 360 °C, correspondendo também ao início da perda de massa da substância (perda de 48,4% da massa inicial). Uma segunda etapa de decomposição, agora exotérmica, foi observada para o pico ascendente na faixa de 360 a 390 °C, correspondendo a uma perda de massa de 24,8%. A partir de 500 °C evidencia-se outro processo exotérmico, atribuído a processos de carbonização, com a formação de carbono elementar. Ao final do experimento, a perda de massa total foi de 94,1%.

Para a ***epi*-iangambina** (Figura 45, p. 124), observou-se o pico do processo de fusão na temperatura de 121,2 °C. Observou-se apenas um processo de decomposição endotérmica na faixa de 260 a 370 °C, com uma perda de massa de 97,2% do valor inicial. O perfil das curvas pode ter sido prejudicado, com menor definição, em virtude da menor quantidade utilizada da *epi*-iangambina (2,5 mg), já que a quantidade de massa utilizada é um fator que pode influenciar as curvas DTA e TG (STORPIRTIS et al., 2009).

Os dados térmicos obtidos divergem das análises de DSC realizadas por Penha (2010) para a iangambina, em que é relatado processo endotérmico de fusão em 105°C. Contudo, os resultados aqui apresentados, associados às análises de ponto de fusão, permitem assegurar o comportamento térmico verdadeiro da iangambina tal como foi observado.

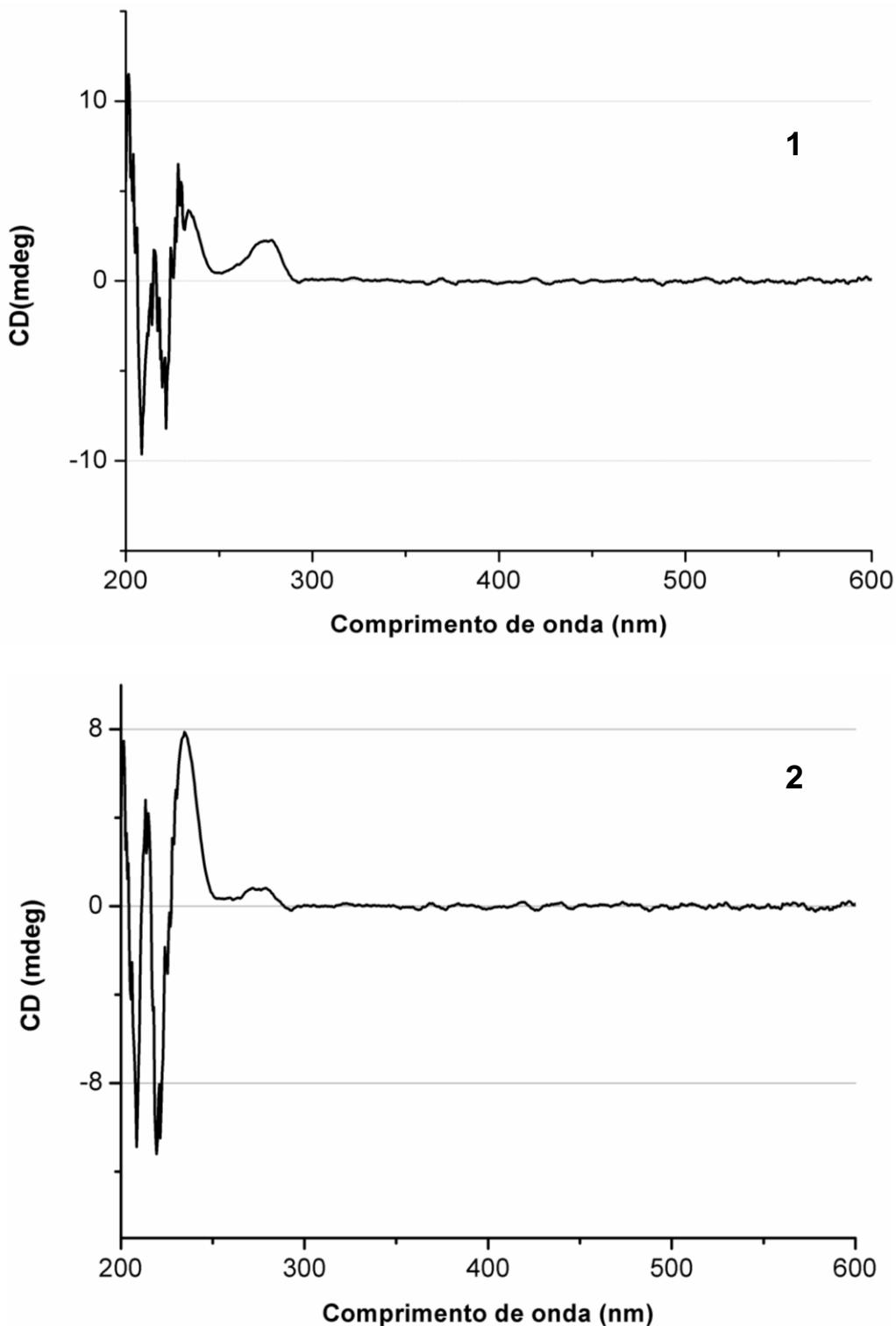
Figura 44 – Curvas TG (em preto) e DTA (em azul) da iangambina**Figura 45 - Curvas TG (em preto) e DTA (em azul) da epi-iangambina**

IV.3.3.7 ROTAÇÃO ÓTICA E DICROÍSMO CIRCULAR

A iangambina apresentou poder rotatório específico (α_D) de +2,9°, enquanto que a *epi*-iangambina apresentou um valor de +6,2°. Esses valores podem sofrer variações dependendo da técnica de análise, mas o desvio rotatório para a direita (+) para essas lignanas encontram-se de acordo com a literatura. (MACRAE;TOWERS, 1985; KIM et al., 2009; MONTE-NETO et al., 2011). Umezawa et al. (1997) também relatam que os enantiômeros predominantes das lignanas com esqueleto dibenzilbutano, furano ou furofurano podem variar entre as espécies vegetais, exercendo influência sobre o poder rotatório.

A utilização da técnica de dicroísmo circular objetivou a determinação da configuração absoluta para os centros quirais da iangambina e *epi*-iangambina, possibilitando gerar mais informações estruturais sobre os epímeros. Trata-se de uma técnica comparativa, o perfil da curva obtida é comparada com outras curvas, da substância analisada ou de outras com esqueleto similar, com configuração absoluta determinada por análise de difração de raios X. A técnica foi útil em demonstrar que as lignanas não são completamente simétricas do ponto de vista ótico, pois apresentam curvas com desvios positivos (Figura 46, p.126). Um exemplo de lignana completamente simétrica é a *cis*-grandisina, que possui eixo e plano de simetrias, sendo oticamente inativa. A curva DC dessa lignana apresenta-se sem nenhum sinal. (RAMOS, 2006).

O trabalho de Hofer e Scholm (1981) acerca da estereoquímica de lignanas furofurânicas traz informações de dicroísmo circular. Segundo os autores, a configuração absoluta (R)(R)(R)(R) de lignanas axiais-axiais, como é o caso da iangambina, implica em duas bandas de DC, surgindo de comprimentos de onda maiores para menores, primeiro positiva e depois negativa. Após comparação dos dados, o assinalamento da estereoquímica dos centros quirais dos isômeros foi definido: (+) (2R, 1R, 5R, 6R)-iangambina e (+) (2S, 1R, 5R, 6R)-*epi*-iangambina

Figura 46 - Espectros de dicroísmo circular da iangambina (1) e epi-iangambina (2)

Capítulo V

Validação da metodologia analítica e quantificação dos epímeros

V.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

V.1.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O processo de qualificar um equipamento, sistema ou validar uma metodologia implica em tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição (VALENTINI et al., 2007). Em outras palavras, validar significa garantir que se obtenha os resultados sempre da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente pré-estabelecidos (MORETTO; SHIB, 2000).

A validação do método analítico apresenta-se como parte integrante da Garantia da Qualidade, a qual engloba todo um conjunto de ações que visam assegurar a confiança necessária de que determinado produto ou serviço satisfaça as exigências quanto à sua qualidade. Assim, tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado e confiável para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (RANDAU et al., 2005; VALENTINI et al., 2007).

No Brasil, a validação de métodos para quantificação de fármacos é regulamentada pela Resolução-RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003). Esse determina que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isto, o método deve ser robusto, apresentar especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação adequados à análise (BRASIL, 2003).

V.1.1.1 SELETIVIDADE / ESPECIFICIDADE

A seletividade está relacionada com 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. Avalia o grau de interferência provocado pela presença de outros compostos na amostra, assegurando que a resposta do pico gerado é referente apenas à substância de interesse (BRASIL, 2003; MATIAS, 2009).

É o primeiro passo no desenvolvimento e validação do método analítico e pode ser avaliada de diversas maneiras. A primeira, através de comparação da matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse, que deve estar bem separado das demais substâncias da amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação da pureza do pico com detectores de arranjo de diodos, comparando o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, utilizando-se isto como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI et al., 2004).

V.1.1.2 LINEARIDADE

A linearidade representa a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Segundo a RE- nº 899/2003, em métodos analíticos, recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes. Caso exista uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear, de modo a determinar o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, visto que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão e incerteza do conjunto de pontos experimentais. A ANVISA estabelece como critério mínimo de aceitação um coeficiente (r) de 0,99 (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

V.1.1.3 PRECISÃO

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e está relacionado ao grau de concordância entre os resultados de cada teste. A partir dos resultados obtidos, calcula-se a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%), expresso em termos de percentagem (RIBANI et al., 2004; VALENTINI et al., 2007). A precisão pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reproduzibilidade.

A repetibilidade (precisão intra-corrida) representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analito e mesma instrumentação. Deve ser verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, em triplicata ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária (precisão inter-corridas) representa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Indica o efeito das variações que podem acontecer no método quando este é sujeito a essas outras condições e tem como objetivo verificar, se no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Já a reproduzibilidade (precisão inter-laboratórios) representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados a padronização de metodologia analítica.

V.1.1.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico está relacionada à proximidade dos resultados obtidos quando comparados a um valor considerado verdadeiro. Juntamente com a precisão, é um importante atributo da validação analítica, demonstrando que não há erros sistemáticos inerentes ao processo (VALENTINI et al., 2007).

Pode ser determinada através de três concentrações: baixa, média e alta, em triplicata, num total de 9 determinações. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo equação abaixo (BRASIL, 2003):

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

V.1.1.5 LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas. Em métodos instrumentais como a CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível que apresente precisão e exatidão aceitáveis. Ou ainda, através da relação sinal: ruído, considerando a concentração que produza uma relação de 10:1 (BRASIL, 2003).

V.1.1.6 ROBUSTEZ

A robustez do método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. O método é considerado robusto quando ele não é afetado por estas modificações. Para avaliar a robustez num método em CLAE pode-se variar certas condições como a concentração do solvente orgânico, pH, força iônica e fluxo da fase móvel em CLAE, temperatura da coluna, coluna de fabricantes diferentes e/ou lotes diferentes, além dos procedimentos de preparo das amostras (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

V.1.2 VALIDAÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

Cada vez mais, o mercado brasileiro tem procurado produtos e tratamento à base de plantas medicinais, entretanto, apesar deste aumento no consumo, as pesquisas brasileiras para a avaliação do uso seguro de fitoterápicos e plantas medicinais ainda são incipientes. Nos últimos vinte anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente e o país carece de levantamentos estatísticos mais precisos da produção nacional dessas plantas e produtos derivados (GUARIM NETO; MORAIS, 2003; MARCHESE et.al., 2004). Um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil ou a possibilidade de exportação é a falta do status de medicamento ético que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário (PINTO et al., 2002). Essa situação, se não for revertida, fará com que as indústrias nacionais de fitoterápicos enfrentem dificuldades para sobreviver no futuro. Apesar de o Brasil possuir uma das maiores biodiversidades mundiais, corre o risco de se tornar importador de matérias-primas vegetais e reprodutor de formulações fitoterápicas, a exemplo do que ocorre com a produção de medicamentos sintéticos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A publicação da Resolução-RDC nº 48 de 16 de Março de 2004 (BRASIL, 2004), a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, possibilitou um controle mais efetivo da qualidade do fitoterápico produzido no território nacional. Segundo a RDC, é exigência da ANVISA a elaboração de um relatório de controle de qualidade, incluindo análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie. A criação da Resolução-RDC nº 14/2010 (BRASIL, 2010) dispõe novas informações acerca do registro de fitoterápicos e revoga a resolução anterior.

Desta forma, destaca-se o papel do desenvolvimento de metodologias analíticas como ferramenta importante para a garantia da qualidade do produto fitoterápico. Através de estudos experimentais, deve-se certificar que os resultados são confiáveis e atendam às exigências descritas nas resoluções, assim, embasando cientificamente o uso seguro do fitoterápico.

V.2. PARTE EXPERIMENTAL

V.2.1 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

A validação analítica foi realizada em cromatógrafo líquido marca Shimadzu da série 10A vp, constituído de duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A vp, módulo controlador SCL-10A vp e injetor manual provido com um loop de amostra de 20 µL (Rheodyne).

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica C18 (ACE-121-2546) com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, com pré-coluna Shimadzu Shim-pack com 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula. No ensaio de robustez, foi utilizada coluna analítica C18 Shimadzu CLC-ODS (228-17873-92) com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, com pré-coluna Phenomenex (KJ0-4282).

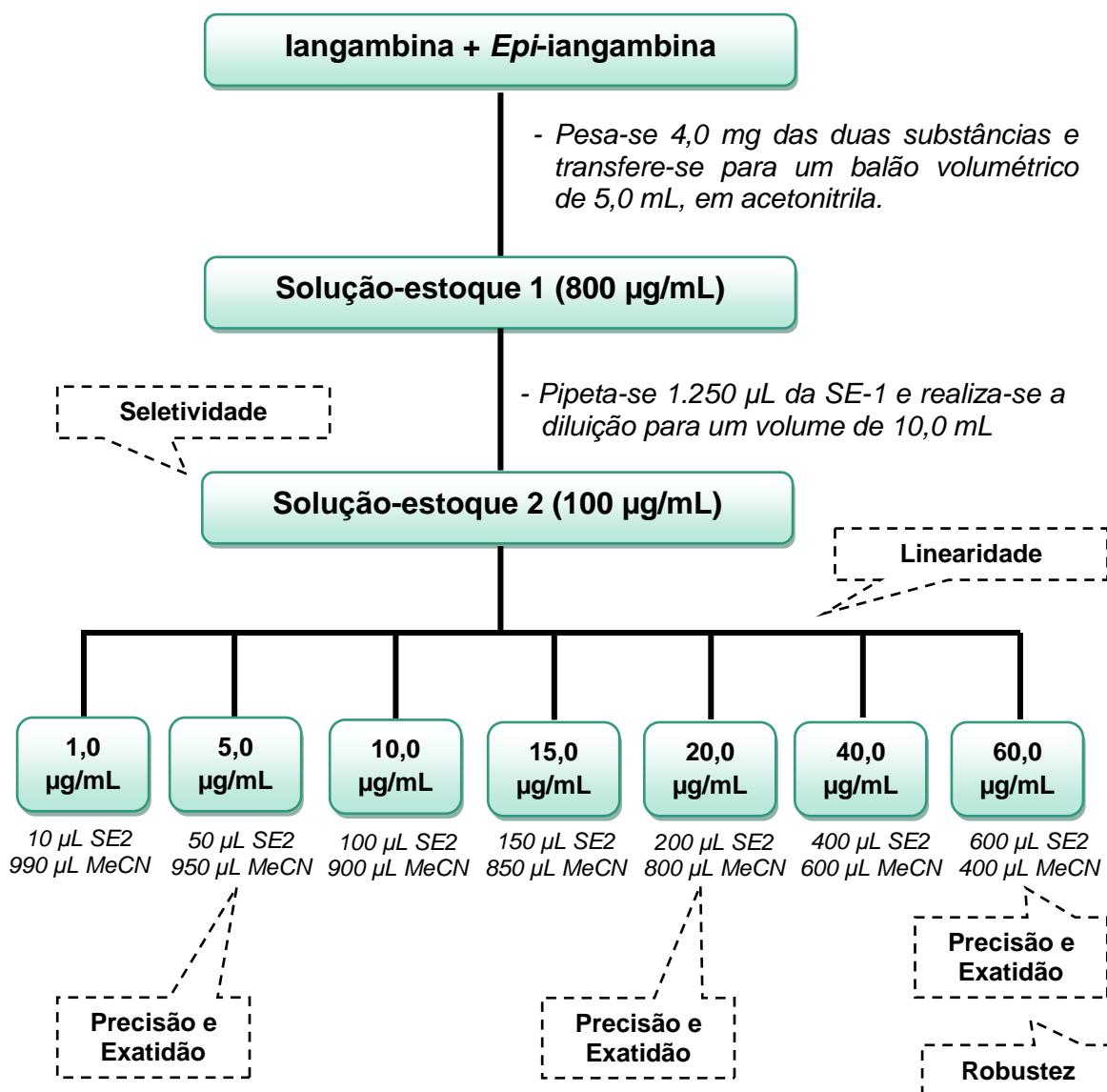
O método de análise utilizado foi desenvolvido no estudo anterior (Capítulo IV), apresentando as seguintes condições: Fase móvel MeCN:H₂O (50:50); Fluxo de 1,0 mL/min; Comprimento de onda de análise de 215 nm; Temperatura ambiente; volume de injeção no cromatógrafo de 60 µL; tempo de corrida de 15 minutos.

A iangambina e *epi*-iangambina purificadas por CLAE semi-preparativa (Capítulo IV) foram utilizadas como padrões fitoquímicos. Para a fase móvel, foi utilizada água ultrapura tipo I (Elga Labwater Purelab Option-Q) e acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker). Na preparação das soluções utilizou-se agitador tipo Vortex (KMC-1300V) e aparelho de banho de ultrassom (Bransonic-1510-MT). Nos estudos de estabilidade térmica/degradação ácida e básica utilizou-se aquecedor tipo “*Dry Block*”, marca TECHNE (DBR-3), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) grau de análise.

V.2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Preparou-se uma solução-estoque (SE-1) da iangambina+*Epi*-iangambina em acetonitrila, na concentração de 800 µg/mL, sendo armazenada à temperatura de -20°C. Uma outra solução-estoque (SE-2) a 100 µg/mL foi preparada a partir de diluição de SE-1. A partir desta foram preparadas soluções a 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 40,0; 60,0 µg/mL (Esquema 8, p. 134), as quais foram utilizadas para o estudo da linearidade. A precisão e exatidão foram avaliadas a partir das concentrações de 5,0; 20,0; e 60,0 µg/mL.

Esquema 8 - Preparo das soluções para a validação da metodologia analítica



V.2.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

V.2.3.1 SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção e perfis de pureza dos dois analitos, através do detector de arranjo de diodos (DAD), em análise de 190 a 400 nm. Inicialmente, preparou-se uma solução a 100 µg/mL do padrão de iangambina e outra solução a 100 µg/mL do padrão de *epi*-iangambina, sendo injetadas no cromatógrafo. A seletividade também foi avaliada nos cromatogramas do EEB e FLT, a uma concentração de 100 µg/mL.

V.2.3.2 LINEARIDADE

A linearidade foi determinada por meio da análise de sete concentrações da iangambina e *epi*-iangambina (Esquema 7, p. 134), sendo o processo repetido três vezes, em dias não-consecutivos. As amostras foram injetadas no cromatógrafo através de injetor manual e as áreas dos picos dos analitos foram utilizadas para a construção da curva de calibração. A média das três curvas obtidas nos três dias foi utilizada para a construção da curva média final e avaliação da linearidade do método. Considerou-se o coeficiente de correlação (*r*) maior ou igual a 0,99 como critério mínimo de aceitação da linearidade. Verificou-se a adequação do modelo linear através do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão.

V.2.3.3 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão e exatidão foram avaliadas através da análise das amostras em três níveis de concentração: Baixa (5,0 µg/mL), Média (20,0 µg/mL) e Alta (60,0 µg/mL). As amostras foram preparadas em quintuplicata e injetadas no cromatógrafo durante três dias de análise para obtenção da precisão e exatidão intra-dia (análises no mesmo dia, efetuadas por um analista) e precisão e exatidão inter-dias (análises em três dias não-consecutivos, efetuadas por outro analista).

Em cada um dos dias, construiu-se uma curva de calibração a partir das três concentrações utilizadas (5,0; 20,0; 60,0 µg/mL). As áreas sobre os picos dos analitos foram relacionadas com as concentrações nominais na curva de calibração, de modo a obter as concentrações experimentais das amostras por regressão linear.

Os resultados de precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão do método, pelo percentual (%) de desvio das concentrações experimentais em relação ao valor teórico.

V.2.3.4 LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O LOD e LOQ da iangambina e *epi*-iangambina foram calculados a partir de uma curva média de calibração (concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 40,0; 60,0 µg/mL) utilizando equações presentes na RE nº 899/2003 da ANVISA:

$$\text{LOD} = \frac{\text{DP}_a \times 3}{\text{IC}} \quad \text{LOQ} = \frac{\text{DP}_a \times 10}{\text{IC}}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo dos Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração

V.2.3.5 ROBUSTEZ

Para avaliação da robustez do método, efetuaram-se variações no fluxo, proporção da fase orgânica e coluna cromatográfica (Tabela 14, p. 137), de modo a observar possíveis alterações em que o método poderia ser submetido. Para o estudo, utilizou-se a amostra de iangambina e *epi*-iangambina na concentração de 60 µg/mL.

Tabela 14 – Variações do método utilizadas para avaliação da robustez

Fluxo (mL/min)	% Acetonitrila	Coluna
0,8	45	Shimadzu
1,2	55	
1,5	60	

V.2.4 ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO DA IANGAMBINA E *EP*-IANGAMBINA

Foi feito um estudo de estabilidade das soluções de iangambina e *epi*-iangambina de modo a observar o surgimento de outros picos cromatográficos durante às análises ou a perda de área dos picos ao longo do tempo. Teve a finalidade de demonstrar que as soluções de trabalho permaneciam confiáveis após certo período de tempo, assegurando a qualidade do estudo de validação.

Foram preparadas soluções em triplicata em dois níveis de concentração: baixa (5,0 µg/mL) e alta (60,0 µg/mL). Estas soluções foram divididas em dois grupos: um primeiro grupo foi acondicionado à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) (A1, A2, A3) enquanto que outro foi acondicionado em freezer (F1, F2, F3), na temperatura de -20°C. Durante um período de 30 dias, as amostras foram analisadas no cromatógrafo, realizando-se as injeções nos pontos: 0, 10, 20 e 30 e, em cada dia de análise, preparou-se soluções de referência (S.ref) nas concentrações de 5,0 µg/mL e 60,0 µg/mL para comparação com as soluções do estudo. As áreas dos picos no dia 0 e dia 30 foram relacionadas a uma regressão linear de uma curva de calibração preparada ao final do estudo, de modo a obter as concentrações das amostras.

V.2.5 DEGRADAÇÃO ÁCIDA E BÁSICA

Adicionou-se 500 µL de uma solução de HCl a 0,1M a 1,0 mg de iangambina e *epi*-iangambina, para uma concentração de 1,0 mg/0,5 mL e deixada em aparelho *Dry Block* numa temperatura de 80°C, por 24h, sendo este procedimento realizado em duplicata. Após esse período, a solução foi neutralizada com solução tampão e diluída a uma concentração de 100 µg/mL para injeção no cromatógrafo. Uma

solução controle ácida (apenas HCl) foi submetida ao mesmo procedimento e injetada no cromatógrafo. Foram feitas comparações com uma solução padrão a 100 µg/mL, a qual não passou pelos processo de degradação. A mesma metodologia foi aplicada à degradação básica, utilizando NaOH.

V.2.6 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA IANGAMBINA E *EPI*IANGAMBINA

Após validação do método, realizou-se a quantificação das lignanas no EEB de *Ocotea duckei* (EEB F10 e A11), bem como na FLT obtida sob as condições experimentais otimizadas de extração (Ultrassom, 20% de concentração do extrato, uma extração, 15 minutos). O método para quantificação foi através de padronização externa. Este método compara a área sobre os picos dos analitos a serem quantificados com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração, de concentração conhecida. Utilizando a equação da curva resultante, pode-se calcular a concentração da substância na amostra a partir da área obtida em uma injeção separada (RIBANI et al., 2004).

Uma curva de calibração (1,0 - 60,0 µg/mL) dos padrões de iangambina e *epi*-iangambina foi construída. Após isso, preparou-se uma solução a 100 µg/mL do EEB F10, EEB A11 e FLT sendo injetados no cromatógrafo para verificação das áreas. Em seguida, a concentração experimental por calibração externa dos epímeros nessas matrizes vegetais foi determinada através da equação da reta da curva construída.

V.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de validação, estabilidade e degradação foi feita utilizando os softwares Excel, versão 2007 (Microsoft) e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

V.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.3.1 SELETIVIDADE

A seletividade tinha como objetivo verificar se o método era capaz de discriminar a identificação e separação da iangambina e seu epímero em relação à outras lignanas presentes na matriz. Através da análise por CLAE-DAD, observou-se a pureza espectroscópica das duas lignanas, observando-se possíveis interferentes numa faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm.

O cromatograma da iangambina (FLT-pico 2) (Figura 47, p. 140) demonstra apenas um pico no tempo de retenção de 9,85 minutos, analisado no comprimento de onda de 215 nm. Na faixa de 190 a 400 nm não foi observado nenhum outro pico interferente e a iangambina apresentou pureza espectroscópica de 1,000, conforme apresentado no Capítulo IV. O cromatograma da epi-iangambina (FLT-pico 3) também apresentou apenas um pico no tempo de retenção de 11,23 minutos, sem a presença de impurezas ou interferentes em região próxima, com pureza espectroscópica de 0,999.

Os cromatogramas do EEB e FLT de *Ocotea duckei* (Figura 48, p. 141) também apresentaram os picos das lignanas em bom formato e resolutos, não apresentando impurezas da matriz nos tempos de retenção considerados. Assim, demonstrando que o método proposto apresenta seletividade para quantificação dos dois epímeros nas matrizes vegetais.

Figura 47 – Análise da seletividade do método para iangambina (à esquerda) e epi-iangambina (à direita). (a) Cromatograma “Contour”; (b) Cromatograma; (c) Curva de pureza (*peak purity*)

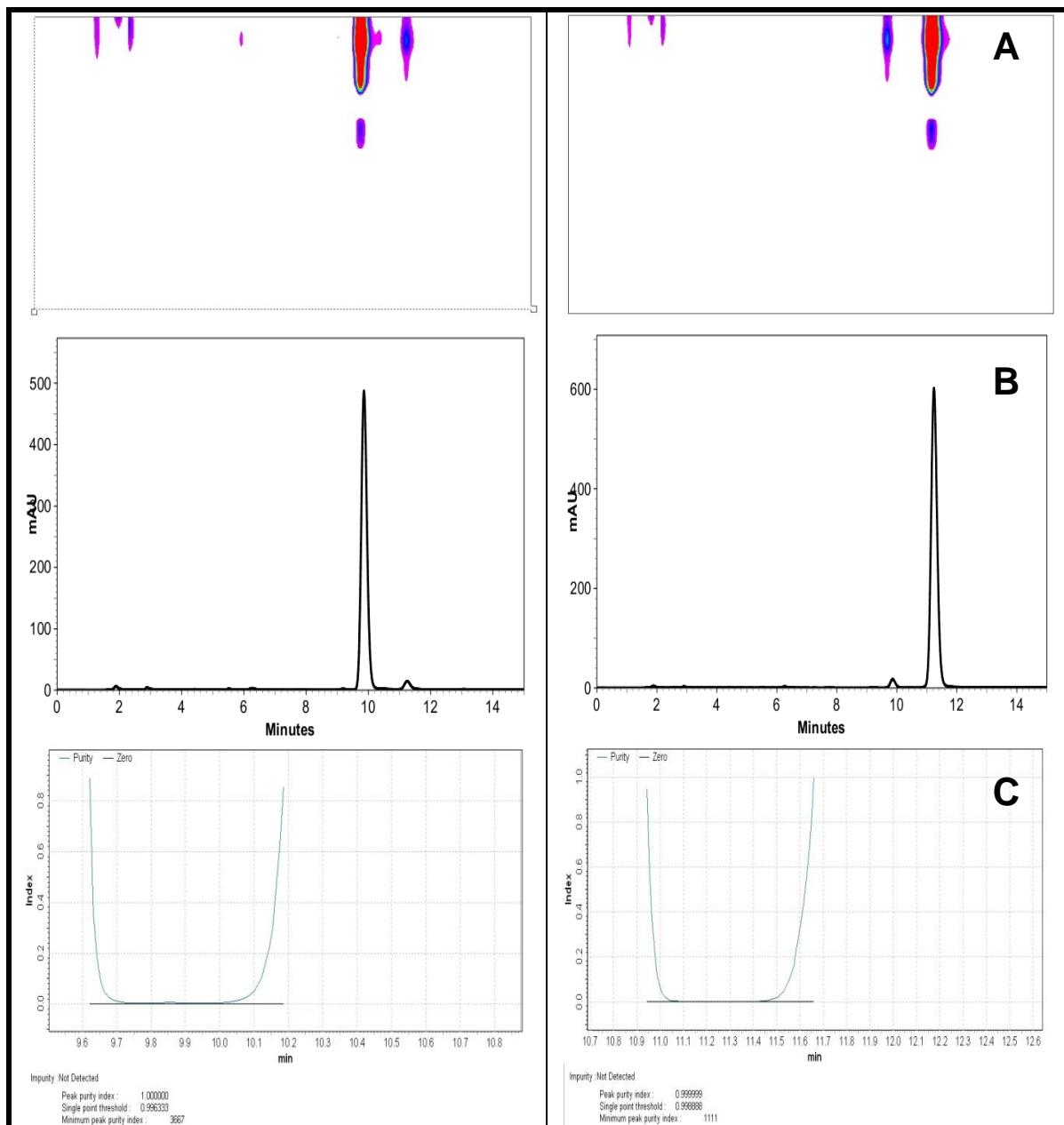
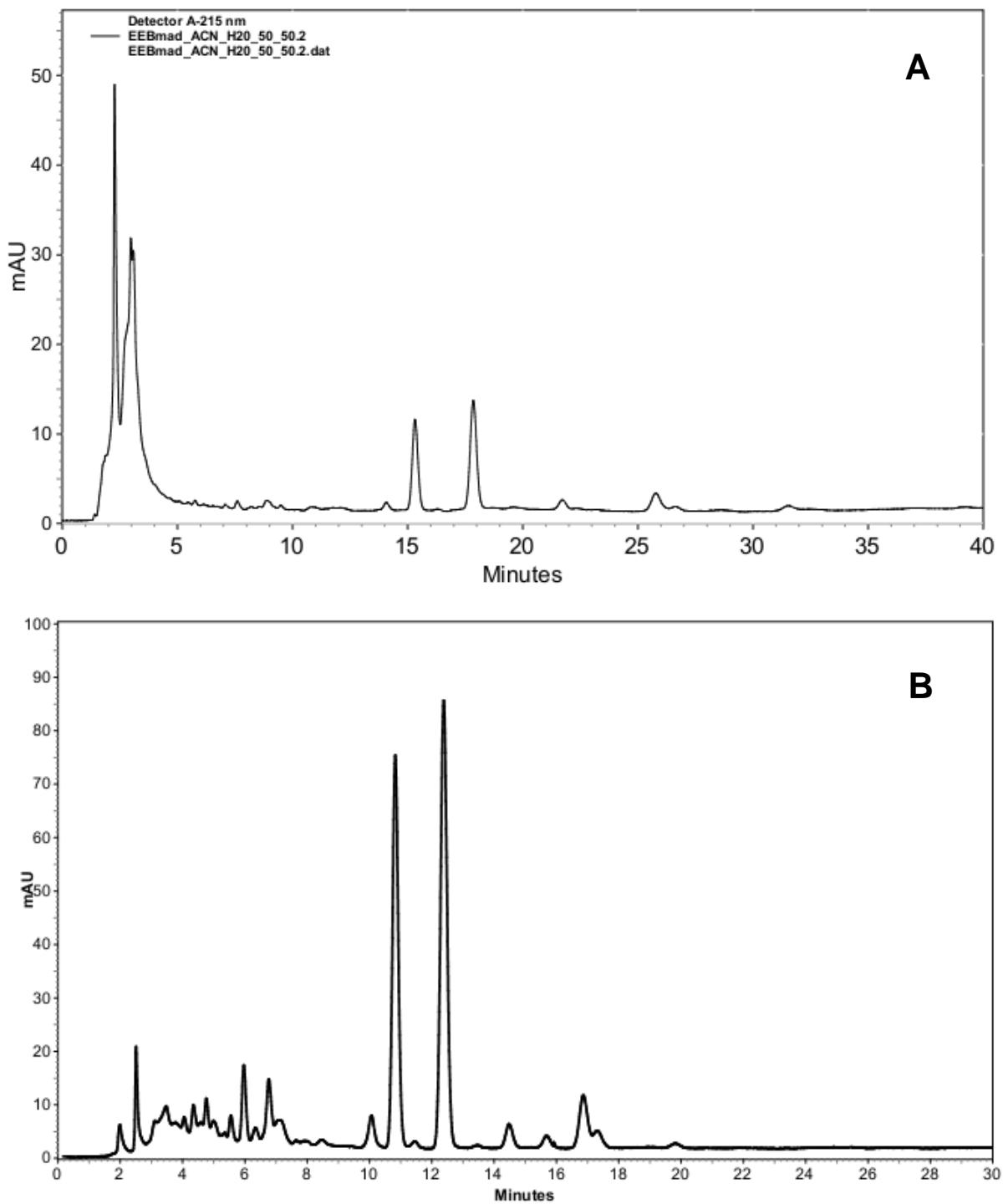


Figura 48 – Análise da seletividade do método para iangambina e epi-iangambina.
(a) Cromatograma do EEB; (b) Cromatograma da FLT



V.3.2 LINEARIDADE

As curvas de calibração por análise de sete concentrações apresentaram boa linearidade, na faixa de 1,0 – 60,0 µg/mL. A tabela 15, p. 143 mostra os resultados da curva obtida para iangambina e *epi*-iangambina no primeiro dia de análise, apresentando r^2 de 0,9996 e 0,9997, respectivamente (Figura 49, p.143). Para o segundo dia de análise, os resultados estão dispostos na tabela 16, p. 144 e as curvas apresentaram r^2 de 0,9998 para a iangambina e 0,9999 para a *epi*-iangambina (Figura 50, p.144). Os resultados para o terceiro dia de análise estão dispostos na Tabela 17, p. 145 e a relação linear está demonstrada na Figura 51 (p. 145), com r^2 de 0,999 para os dois epímeros.

Uma curva média para avaliação da linearidade final foi obtida a partir das curvas de calibração dos três dias (Tabela 18 e Figura 52, p. 146), apresentando o valor de $r^2 = 0,9999$ para a iangambina e $r^2 = 1$ para a *epi*-iangambina. O cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão da curva média (Figura 53, p. 147) confirmou a validade do modelo de calibração adotado, demonstrando que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero e a heterogeneidade das variâncias.

Os resultados obtidos estão de acordo com o proposto para a validação de metodologias analíticas, segundo a RE nº 899/2003 da ANVISA, a qual estabelece valor mínimo do coeficiente de correlação de 0,99. De modo a ilustrar a relação linear existente entre a concentração do analito e a área sobre o seu pico, o cromatograma das concentrações utilizadas no estudo da linearidade está mostrado na Figura 54, p. 147.

Tabela 15 – Resultados da curva de calibração do primeiro dia de análise

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área sobre o pico	
	langambina	Epi-iangambina
1,0	49116	57864
5,0	250469	285871
10,0	541191	617666
15,0	838299	947883
20,0	1041131	1189101
40,0	2152587	2431166
60,0	3183259	3607258

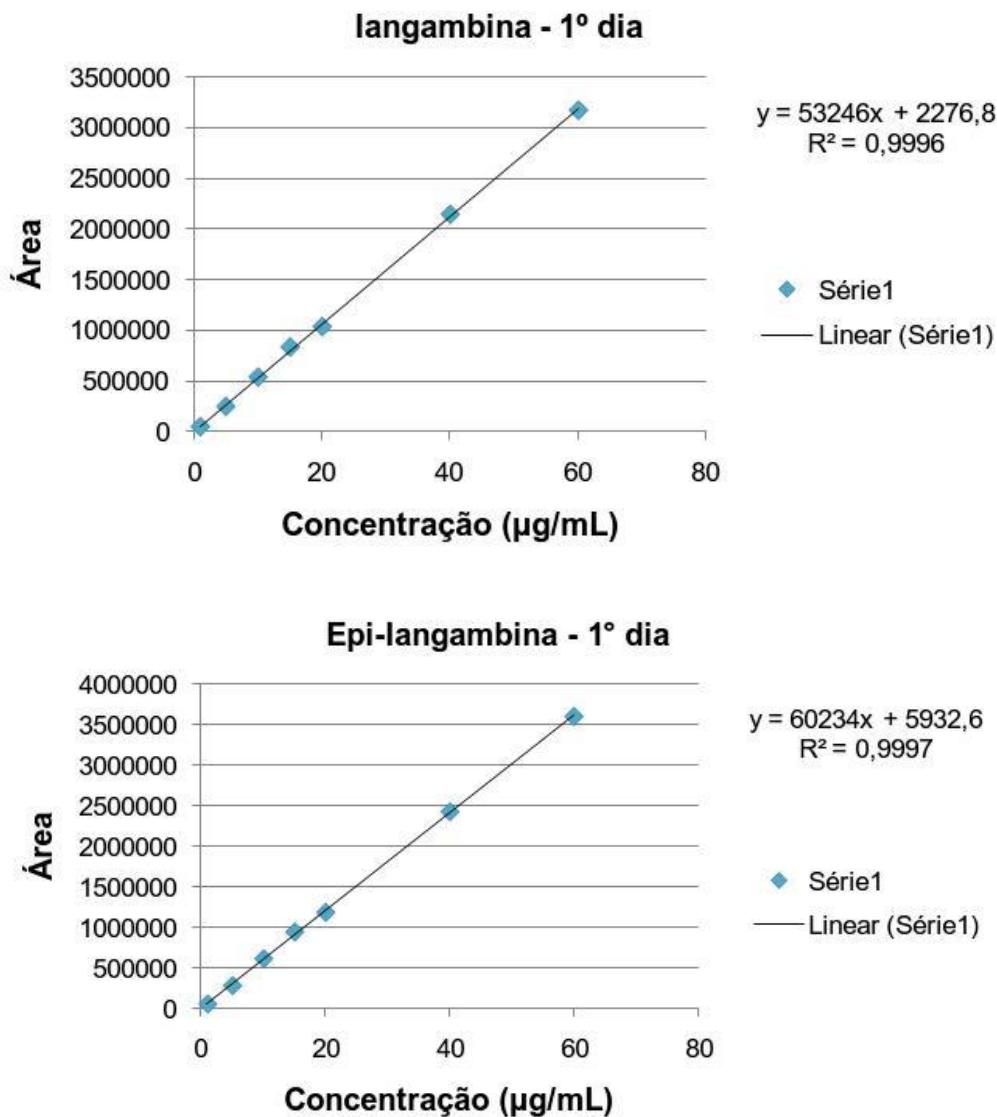
Figura 49 – Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise.

Tabela 16 - Resultados da curva de calibração do segundo dia de análise

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área sobre o pico	
	langambina	Epi-iangambina
1,0	56013	65673
5,0	284045	325876
10,0	558203	631500
15,0	791143	902231
20,0	1078429	1224717
40,0	2167564	2449916
60,0	3205993	3630444

Figura 50 - Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise.

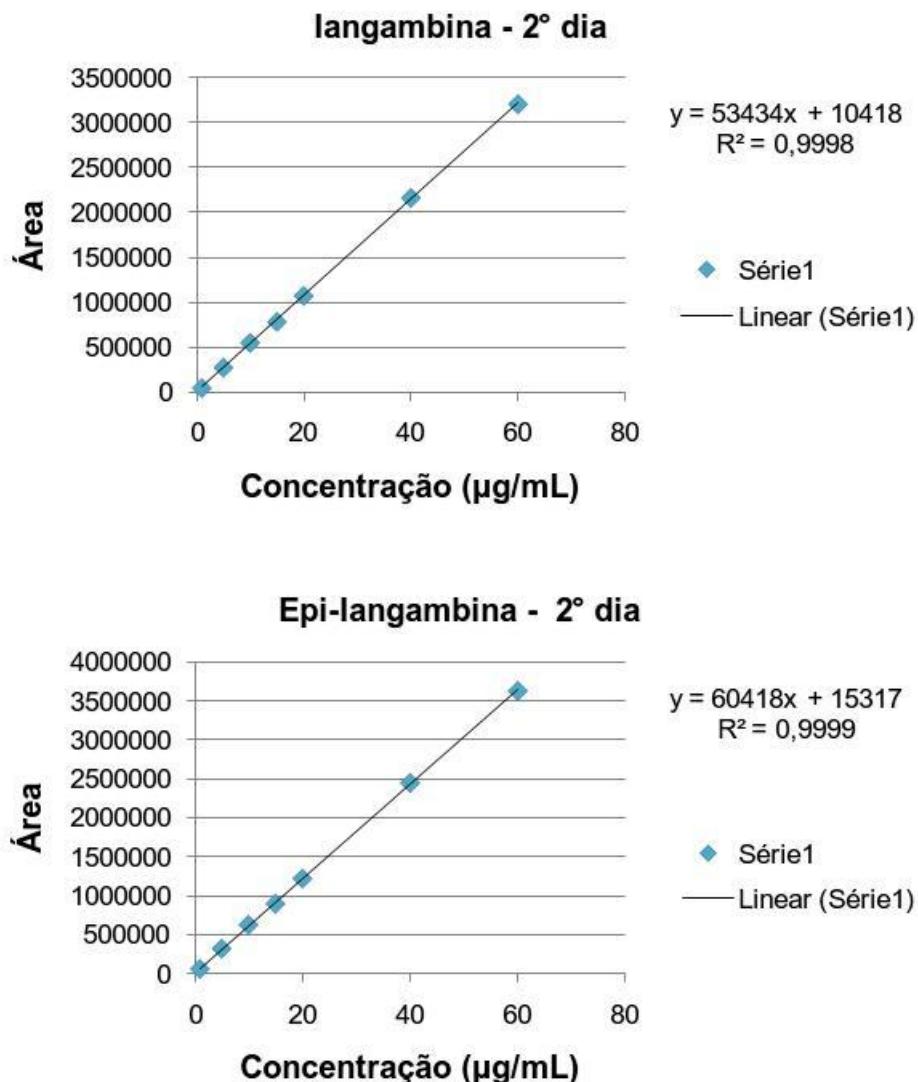


Tabela 17 - Resultados da curva de calibração do terceiro dia de análise

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área sobre o pico	
	langambina	Epi-iangambina
1,0	63943	71673
5,0	275129	318872
10,0	529149	602761
15,0	793092	902528
20,0	1067561	1203306
40,0	2156431	2438792
60,0	3224267	3653244

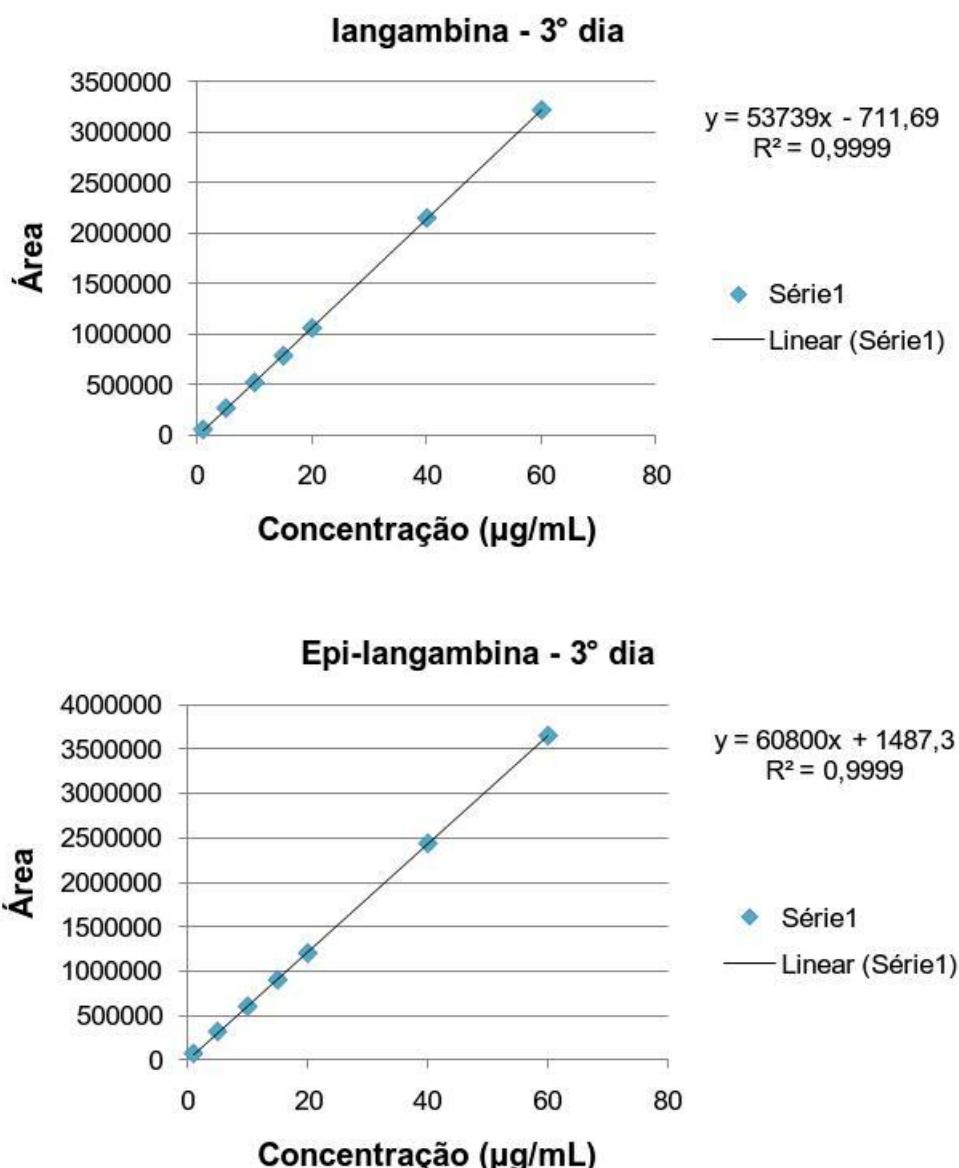
Figura 51 - Regressão linear das curvas de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise.

Tabela 18 – Resultados da curva média de calibração

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área Média	
	langambina	Epi-iangambina
1,0	56357	65070
5,0	269881	310206
10,0	542848	617309
15,0	807511	917547
20,0	1062374	1205708
40,0	2158861	2439958
60,0	3204506	3630315

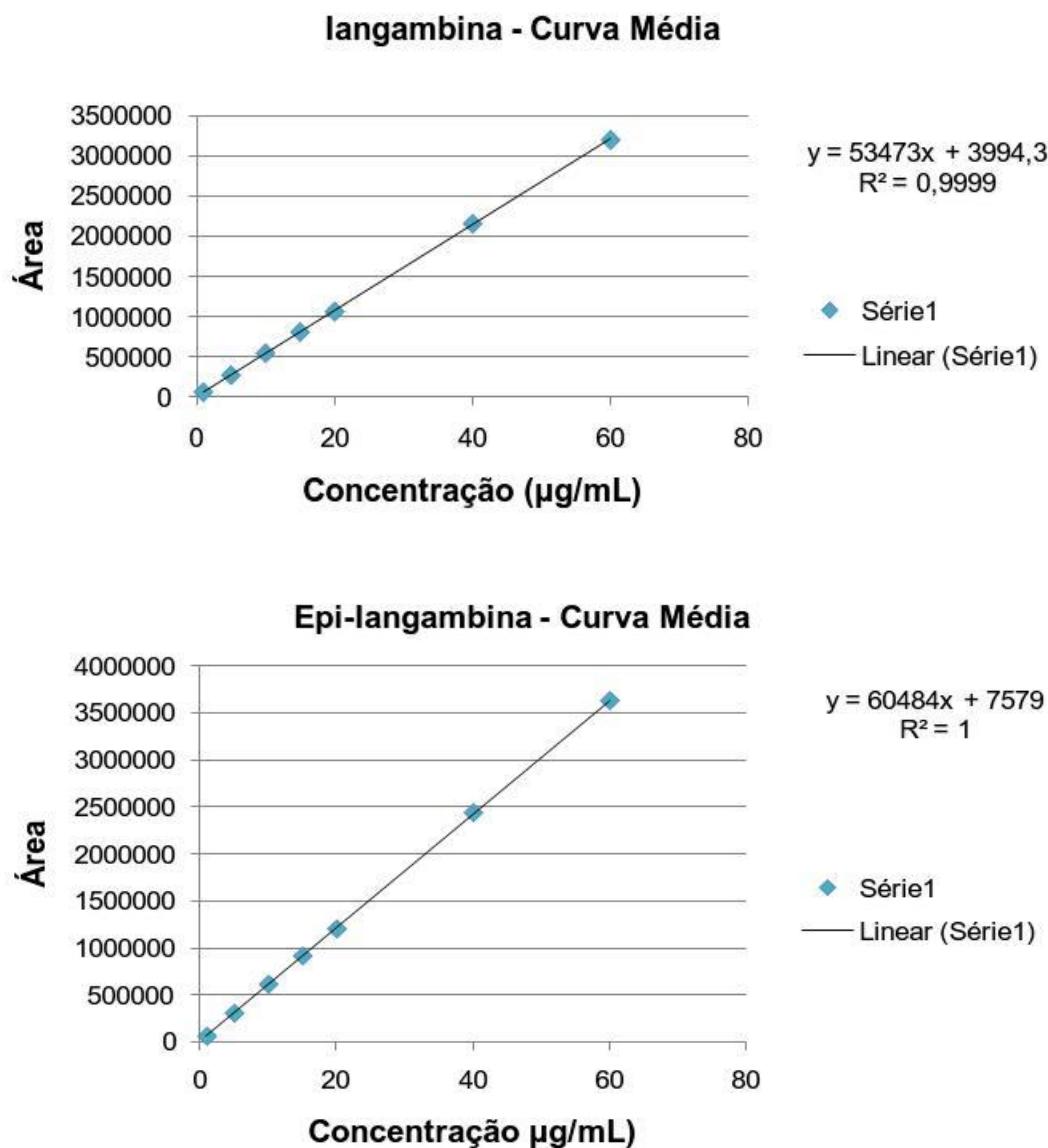
Figura 52 – Regressão linear da curva média de calibração (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$) para iangambina e epi-iangambina

Figura 53 – Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade, obtido a partir da curva média de calibração

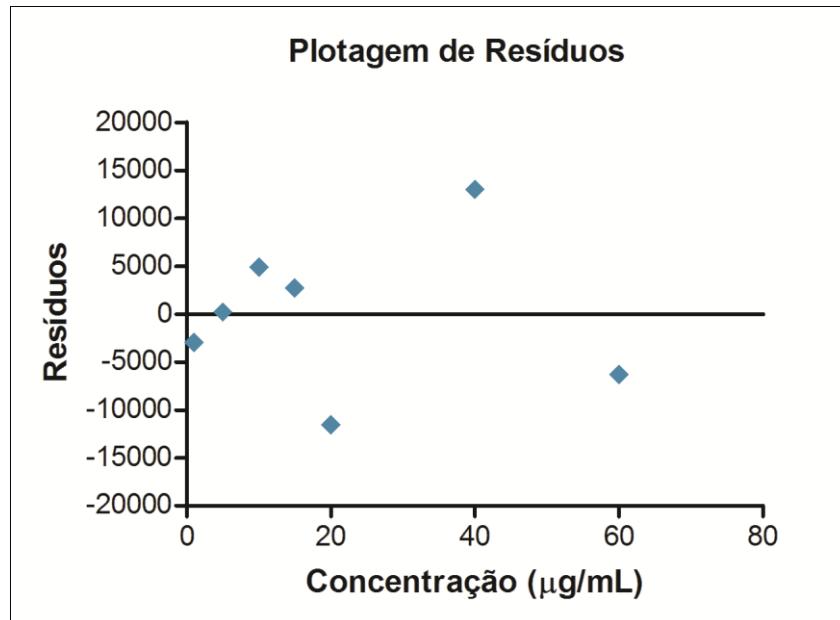
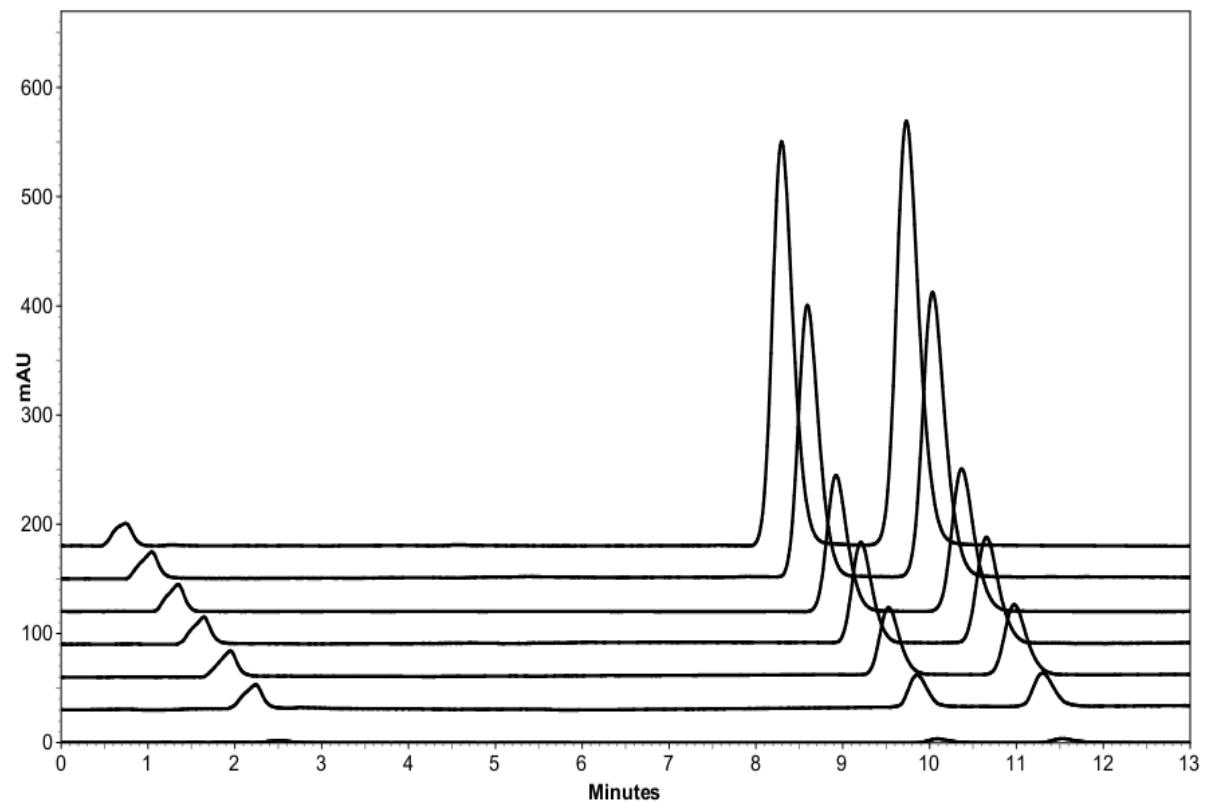


Figura 54 – Cromatogramas sobrepostos da iangambina e epi-iangambina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (1,0 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$)



V.3.3 PRECISÃO E EXATIDÃO

Os resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) do primeiro dia de análise mostraram variações menores que 4,0% para a iangambina e menores que 5,0% para a epi-iangambina, sendo esses desvios relacionados para o nível baixo de concentração (5,0 µg/mL) (Tabela 19, p. 149).

No segundo dia de análise, a concentração de 20,0 µg/mL foi a que apresentou maiores variações, com 3,19% para a iangambina e 3,25% para a epi-iangambina, contudo, dentro do limite de aceitação ($CV \leq 5\%$) conforme especificado na RE-nº 899/2003 (Tabela 20, p. 149).

Para o terceiro dia de análise da precisão intra-dia, os valores encontrados não ultrapassaram 2,0% nos três níveis de concentração, para os dois epímeros (Tabela 21, p. 149). Os resultados da precisão inter-dias forneceram valores abaixo de 3,0% para todas as concentrações testadas, tanto para iangambina como para epi-iangambina (Tabela 22, p. 150). Observou-se que a relação da precisão com a concentração associada segue uma função matemática exponencial (com r^2 de 0,999), conforme demonstrado na Figura 55 (p. 150). Isso significa que quanto maior a concentração utilizada, menores serão as dispersões de resultados ou variações quando submetidos a medições, até determinado ponto (A curva atingindo o eixo X implicaria na existência de uma precisão absoluta, com 0 % de variação).

A exatidão foi calculada a partir dos dados de precisão, intra-dia e inter-dias. A partir da equação da reta da regressão linear calculou-se a concentração experimental da amostra, através da substituição da variável y da equação pela área sobre o pico, encontrada após as análises cromatográficas. Assim, comparadas à concentração teórica (nominal) para cálculo da exatidão do método. Os resultados da exatidão intra-dias e inter-dias estão demonstrados nas Tabelas 23 a 26 (p.151 e 152). Os valores de exatidão determinados também se encontram dentro dos critérios estabelecidos pela RE-nº 899/2003, a qual preconiza um intervalo de 95 a 105 % do valor nominal da concentração.

Tabela 19 – Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise (n = 5)

Amostras	langambina			Epi-langambina		
	Concentração (µg/mL)			Concentração (µg/mL)		
	n	5	20	60	5	20
1	252243	1056171	3180498	285510	1191646	3602163
2	264492	1055612	3208372	299080	1202426	3631010
3	278547	1056758	3186594	316715	1204841	3607930
4	269868	1061896	3184577	306038	1202339	3600212
5	277263	1057045	3173321	314695	1198946	3608697
Média	268483	1056171	3186672	304408	1200040	3610002
DP	10723,3	2520,6	13149,6	12703,0	5140,1	12294,6
Precisão (CV%)	3,99	0,24	0,41	4,17	0,43	0,34

Tabela 20 - Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise (n = 5)

Amostras	langambina			Epi-langambina		
	Concentração (µg/mL)			Concentração (µg/mL)		
	n	5	20	60	5	20
1	274126	1119233	3351981	312550	1271747	3802964
2	289232	1146678	3372283	330545	1302649	3808571
3	283893	1152695	3401076	321489	1307860	3847191
4	287788	1065455	3367485	324445	1206787	3824386
5	287686	1143200	3422120	327611	1295380	3877647
Média	284545	1125452	3382989	323328	1276885	3832152
DP	6150,8	35867,9	28173,0	6914,2	41549,5	30676,9
Precisão (CV%)	2,16	3,19	0,83	2,14	3,25	0,80

Tabela 21 - Resultados da precisão intra-dia (repetibilidade) para a iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise (n = 5)

Amostras	langambina			Epi-langambina		
	Concentração (µg/mL)			Concentração (µg/mL)		
	n	5	20	60	5	20
1	286932	1119498	3342334	327965	1266799	3785941
2	298078	1150248	3376215	340389	1298259	3837955
3	294001	1158428	3402662	336252	1312982	3862378
4	296026	1137941	3374166	339660	1291582	3836403
5	293927	1127610	3391586	337368	1278035	3844030
Média	293793	1138745	3377393	336327	1289531	3833341
DP	4197,7	15928,1	22808,4	4965,4	17883,2	28437,8
Precisão (CV%)	1,43	1,40	0,68	1,48	1,39	0,74

Tabela 22 - Resultados da precisão inter-dias (precisão intermediária) para a iangambina e epi-iangambina ($n = 3$)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão Inter-dias (CV%) *	
	Iangambina	Epi-iangambina
5,0	$2,53 \pm 1,3$	$2,60 \pm 1,4$
20,0	$1,61 \pm 1,5$	$1,69 \pm 1,4$
60,0	$0,64 \pm 0,2$	$0,63 \pm 0,3$

* Os resultados foram expressos como média dos três dias \pm desvio padrão (DP)

Figura 55 – Curvas de precisão da iangambina e epi-iangambina, demonstrando a relação exponencial da precisão e concentração.

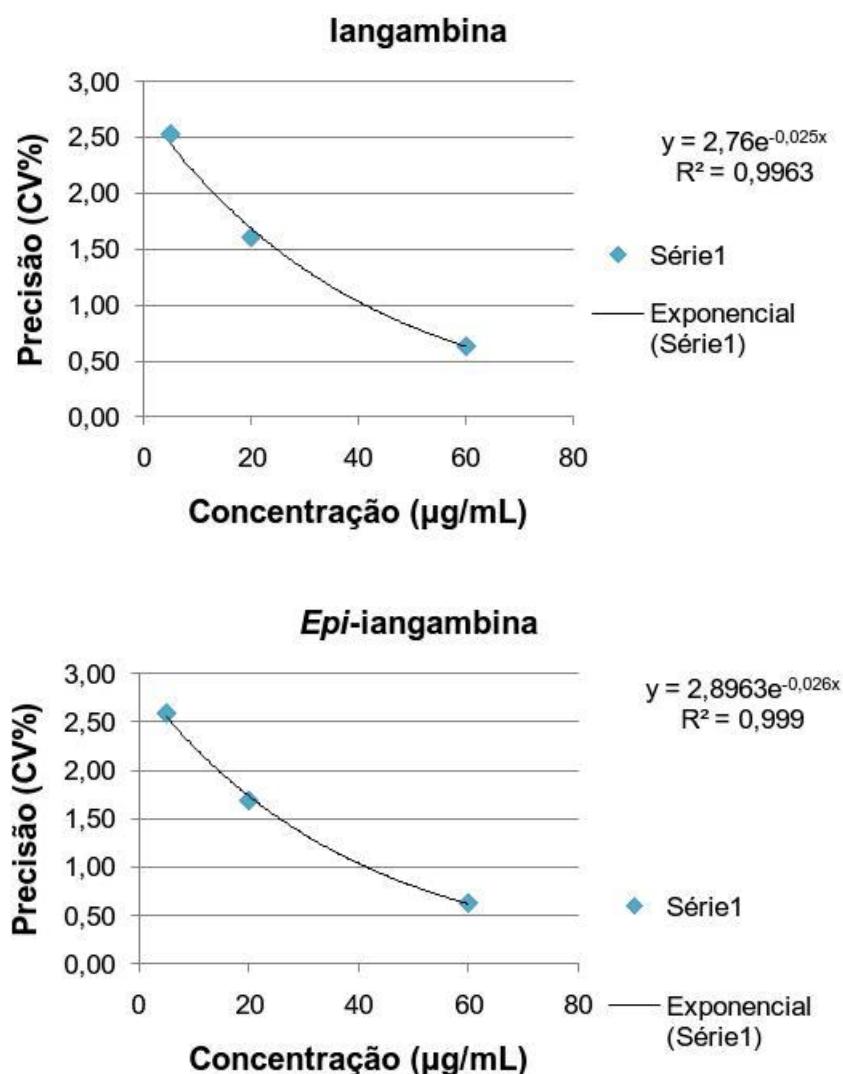


Tabela 23 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no primeiro dia de análise (n = 5)

Amostras	Iangambina			Epi-iangambina		
	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)			Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	n	5	20	60	5	20
1	4,75	19,89	59,91	4,73	19,80	59,89
2	4,98	19,88	60,43	4,96	19,98	60,37
3	5,25	19,91	60,02	5,25	20,02	59,98
4	5,08	20,00	59,98	5,07	19,98	59,85
5	5,22	19,91	59,77	5,22	19,92	60,00
Média	5,06	19,92	60,02	5,04	19,94	60,02
Exatidão média(%)	101,17	99,60	100,04	100,89	99,69	100,03

Tabela 24 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no segundo dia de análise (n = 5)

Amostras	Iangambina			Epi-iangambina		
	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)			Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	n	5	20	60	5	20
1	4,85	19,84	59,46	4,86	19,89	59,55
2	5,12	20,33	59,82	5,14	20,37	59,64
3	5,02	20,44	60,33	5,00	20,45	60,25
4	5,09	18,89	59,74	5,04	18,87	59,89
5	5,09	20,27	60,71	5,09	20,26	60,72
Média	5,03	19,95	60,01	5,02	19,97	60,01
Exatidão média(%)	100,66	99,77	100,02	100,48	99,83	100,02

Tabela 25 - Resultados da exatidão intra-dia para a iangambina e epi-iangambina, no terceiro dia de análise (n = 5)

Amostras	Iangambina			Epi-iangambina		
	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)			Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	n	5	20	60	5	20
1	4,85	19,70	59,36	4,87	19,64	59,26
2	5,04	20,25	59,97	5,07	20,13	60,07
3	4,97	20,40	60,44	5,00	20,36	60,46
4	5,01	20,03	59,93	5,06	20,03	60,05
5	4,97	19,85	60,24	5,02	19,81	60,17
Média	4,97	20,04	59,99	5,00	19,99	60,00
Exatidão média(%)	99,36	100,22	99,98	100,07	99,97	100,00

Tabela 26 - Resultados da exatidão inter-dias para a iangambina e epi-iangambina ($n = 3$)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão Inter-dias (%) *	
	Iangambina	Epi-iangambina
5,0	100,40 \pm 0,9	100,48 \pm 0,4
20,0	99,86 \pm 0,3	99,83 \pm 0,1
60,0	100,01 \pm 0,0	100,02 \pm 0,0

* Os resultados foram expressos como média dos três dias \pm desvio padrão (DP)

V.3.4 LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Foi possível determinar os limites de forma teórica, através de extrapolação matemática da curva de calibração, segundo equação descrita na RE nº 899/2003. O limite de detecção para a iangambina foi de 0,22 $\mu\text{g/mL}$ enquanto seu epímero apresentou o valor de 0,37 $\mu\text{g/mL}$. A iangambina e epi-iangambina apresentaram limites de quantificação de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ e 1,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

V.3.5 ROBUSTEZ

Para avaliação da robustez considerou-se o método original (Coluna ACE, fluxo de 1,0 mL/min e fase móvel MeCN:H₂O (50:50), como nível padrão, sem variações, para comparação dos efeitos provocados pela alteração no método.

Na avaliação das condições de mudança de fluxo, observou-se que uma diminuição de 0,2 mL/min do método original (fluxo de 0,8 mL/min) alterou o tempo de retenção dos analitos, causando um atraso na eluição (13,29 min e 15,20 min). O analito fica um pouco mais retido na coluna em virtude da redução do fluxo, pois também há maior tempo para ocorrer as interações fase estacionária-analito-fase móvel. Já um aumento de 0,2mL/min (fluxo de 1,2 mL/min) proporcionou um leve decréscimo no tempo de retenção dos epímeros (10,71 min e 12,32 min); o aumento para 1,5 mL/min levou a um decréscimo maior (8,65 min e 9,94 min), com leve perda da resolução entre os picos.

Em relação às variações na percentagem de acetonitrila na constituição da fase móvel, observou-se que uma redução de 5% provocou eluição tardia dos

analitos (14,09 min e 16, 42 min), implicando em uma boa afinidade dos analitos pela acetonitrila, necessária para “arrastar” estas substâncias da fase estacionária, promovendo a eluição. Isto foi confirmado pelo aumento de 5% da proporção de MeCN, que causou decréscimo no tempo de retenção para 8,10 min e 9,03. Aumentando para 10%, observou-se retenção em 6,24 e 6,86, com resolução prejudicada. Não se observou diferenças significativas pela alteração do fabricante da coluna, com os picos em mesmo formato, resolução e tempos de retenção ligeiramente maiores (10,09 min e 12,60 min).

V.3.6 ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO DA IANGAMBINA E *EPH*-IANGAMBINA

No estudo de estabilidade, a figura 56 (p. 154) demonstra os resultados obtidos para a **iangambina**, expressos pela média das triplicatas + DP. Em análise estatística usando o teste t não-pareado, não foi observado variação significativa ($p < 0,05$) nas concentrações das amostras ambiente e freezer em relação à amostra referência, nas duas concentrações testadas. As concentrações das amostras analisadas no dia 30 apresentaram as seguintes variações em relação ao dia 0: Para 5,0 µg/mL, tem-se uma variação de +11,8 e -0,4%, nas amostras ambiente e freezer, respectivamente; para 60,0 µg/mL, tem-se uma variação de +4,3 e +1,9% nas amostras ambiente e freezer, respectivamente. A variação de área ao longo dos 30 dias foi maior para as amostras ambiente na concentração de 5,0 e 60,0 µg/mL, em relação às amostras freezer, entretanto essas variações também não apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

A figura 57 (p.155) demonstra os resultados obtidos para a **epi-iangambina**, expressos pela média das triplicatas + DP. As concentrações das amostras analisadas no dia 30 apresentaram as seguintes variações em relação ao dia 0: Para 5,0 µg/mL tem-se uma variação de +29,2 e +0,1%, nas amostras ambiente e freezer, respectivamente; para 60,0 µg/mL tem-se uma variação de +5,4 e +2,3%, nas amostras ambiente e freezer, respectivamente. Em análise estatística usando o teste t não-pareado, não foi observado variação significativa ($p < 0,05$) nas concentrações das amostras ambiente e freezer em relação à amostra referência, nas duas concentrações testadas. A variação de área ao longo dos 30 dias foi maior para as amostras ambiente na concentração de 5,0 e 60,0 µg/mL, em relação às

amostras freezer, entretanto essas variações também não apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

O estudo de estabilidade em solução mostrou que, após os 30 dias de análise, não houve nenhuma variação significativa nas áreas dos picos, tanto para iangambina como para *epi*-iangambina, nas duas concentrações testadas, dessa forma, comprovando que as duas lignanas são bastante estáveis.

Figura 56 – Resultados do estudo de estabilidade em solução para a iangambina

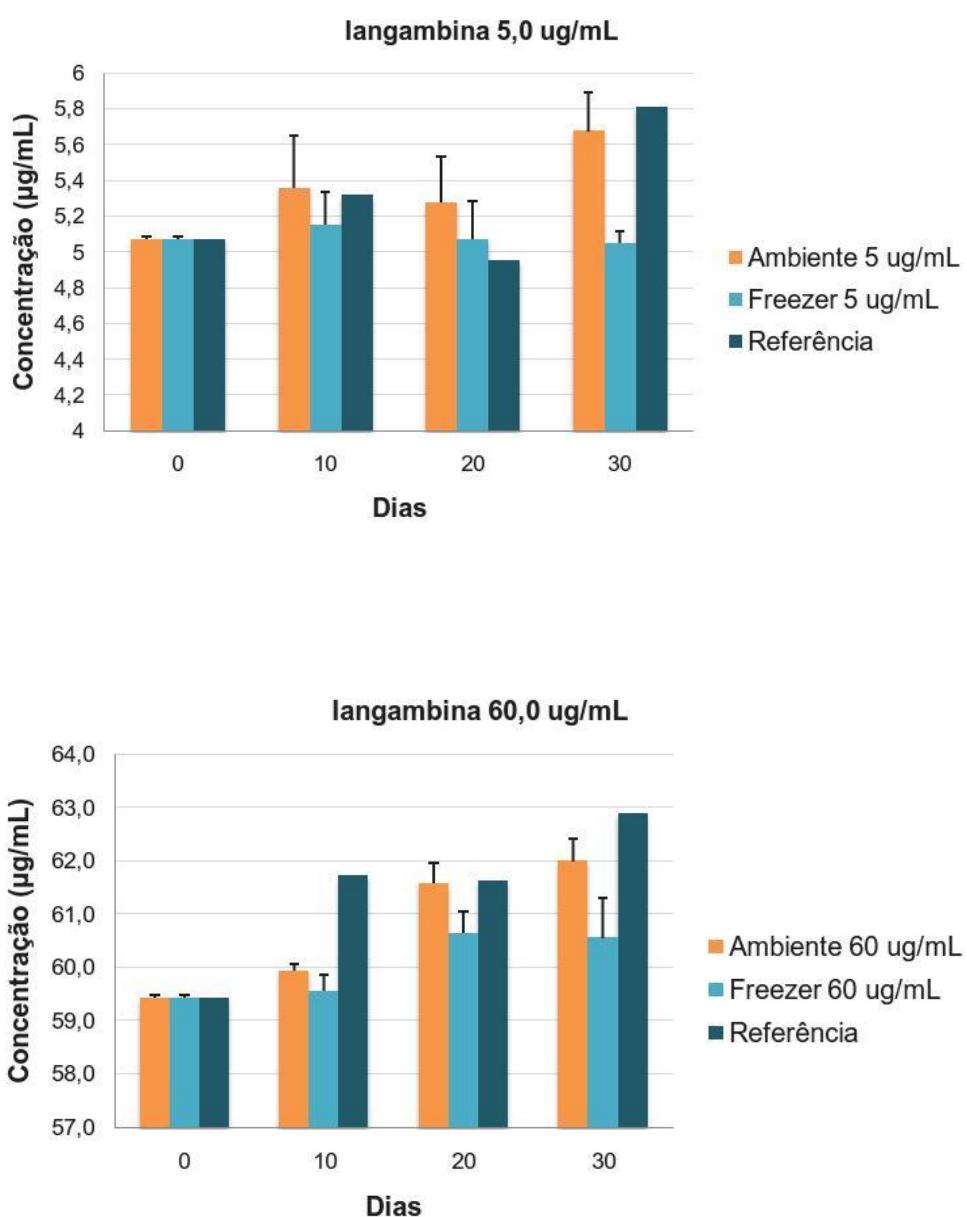
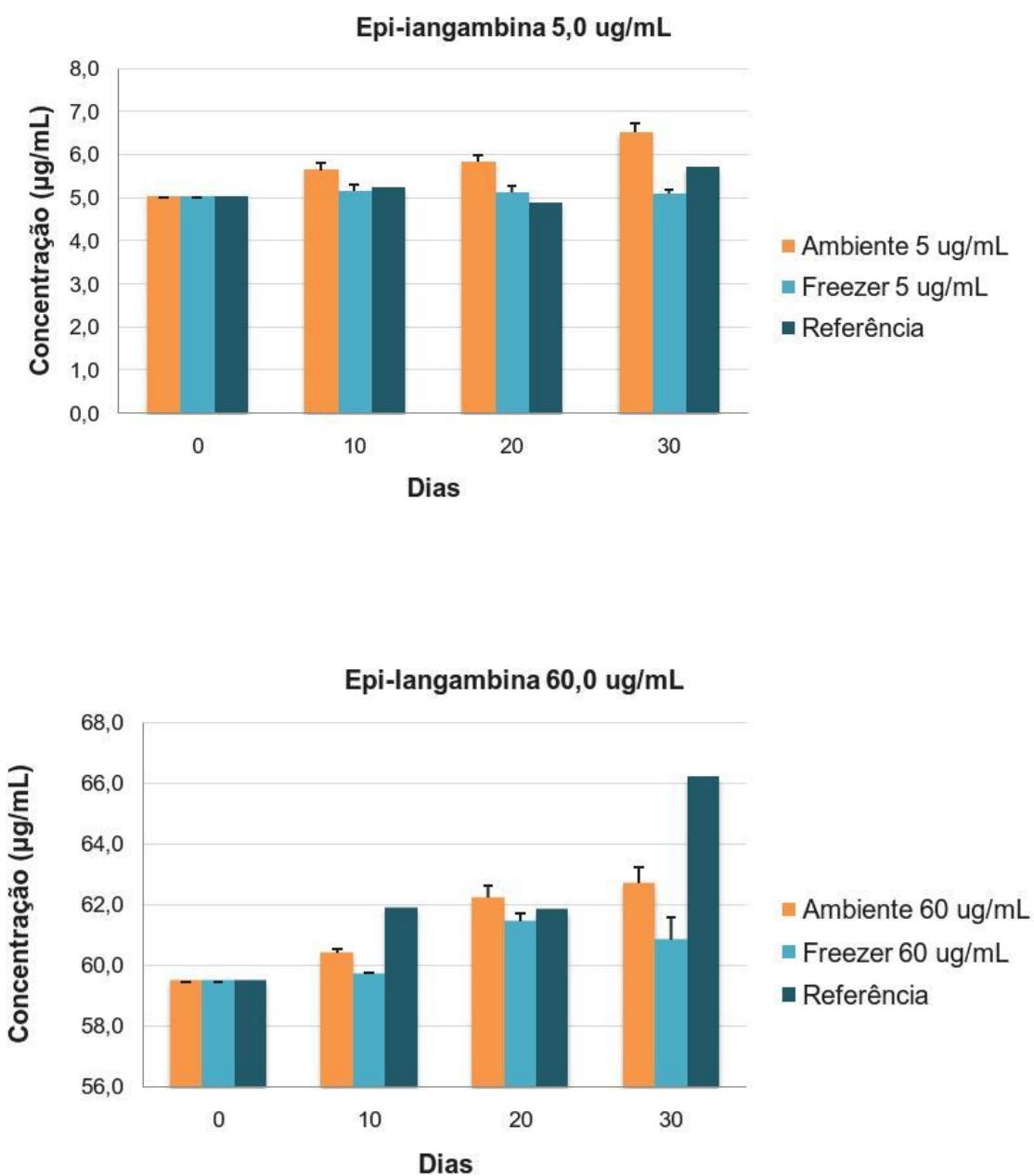


Figura 57 - Resultados do estudo de estabilidade em solução para a epi-iangambina

V.3.7 DEGRADAÇÃO ÁCIDA E BÁSICA

Com o processo de degradação de uma determinada amostra, outros picos podem aparecer no cromatograma, podendo interferir na análise da substância de interesse. Os ensaios de degradação também podem ser utilizados para avaliar a seletividade do método para o analito, pois permite observar se o pico da substância

permanece em bom formato e assimetria, sem impurezas e produtos de degradação em co-eluição. O objetivo do estudo foi observar o comportamento da iangambina e epi-iangambina frente à condições extremas de temperatura e pH, possibilitando maiores informações acerca da estabilidade da molécula.

Os picos da iangambina e epi-iangambina (Figura 58, p.157) não sofreram alterações nos tempos de retenção, assimetria e pureza, após o período de 24h, sob temperatura de 80°C e condições ácidas e alcalinas, comprovando a estabilidade das duas lignanas, já observada no estudo térmico (Capítulo IV) e estabilidade em solução. Não houve aparecimento de nenhum pico relativo à degradação, tanto para a hidrólise ácida quanto básica, para as duas lignanas. Os picos com tempos de retenção na faixa de 2,3 minutos foram atribuídos a traços residuais de HCl e NaOH, após comparação com os cromatogramas das soluções controle.

Na degradação ácida, observou-se uma redução de 18,3 % da área do pico da epi-iangambina; para a iangambina essa redução foi de apenas 1,39%, sugerindo-se uma maior estabilidade térmica/ácida para essa lignana. Em relação à degradação básica, observou-se um aumento da área do pico para os dois epímeros, no valor de 4,86% para iangambina e 3,17% para a epi-iangambina. A redução de 18,3 % da área da epi-iangambina pode não refletir um processo de degradação pois pode estar relacionada a erros na pesagem das substâncias e/ou variações do próprio experimento. Assim, novos testes mais conclusivos são necessários, com maior número de replicatas, visto que o experimento apresentou desvios padrões muito altos, prejudicando a confiabilidade dos resultados.

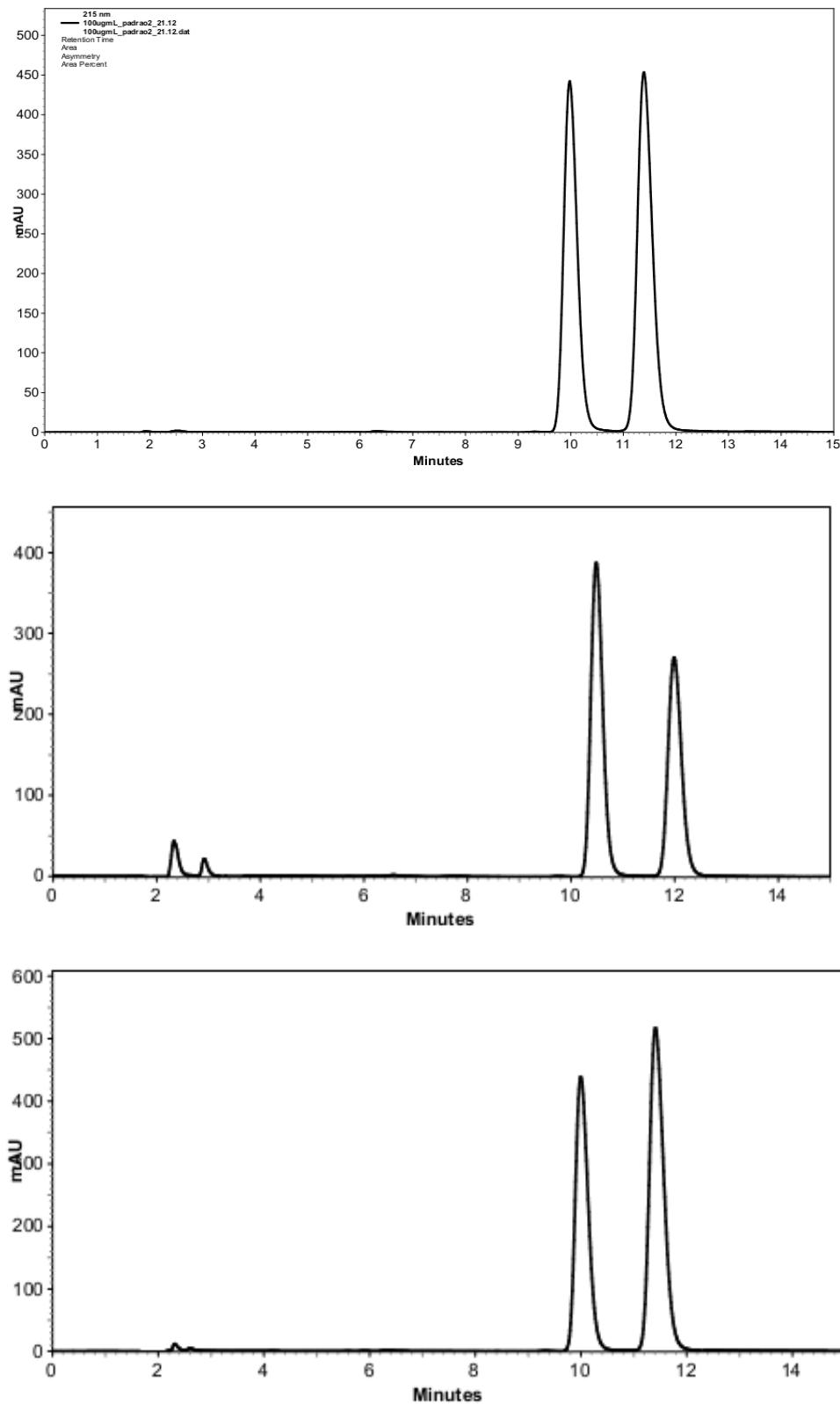
Tabela 27 – Resultados do estudo de degradação ácida e básica da iangambina e epi-iangambina

Amostras	Padrão *		HCl (0,1M)		NaOH (0,1M)	
	Área sobre o pico		Área sobre o pico		Área sobre o pico	
N	Ian	Epi	Ian	Epi	Ian	Epi
1	8022256	9108664	5712531	5202593	6849211	6179999
2	5620521	6380194	7741046	7439343	7456256	9799156
Média Área (%) ^a	6821389 100,00	7744429 100,00	6726789 98,61	6320968 81,62	7152734 104,86	7989578 103,17
Variação da área (%)	0,00	0,00	-1,39	-18,38	+4,86	+3,17

* Solução que não passou pelo processo de degradação ácida/básica

^a Atribuído o valor de 100,00% para a solução padrão

Figura 58 – Cromatogramas do estudo de degradação ácida e básica. (a) Solução padrão; (b) Solução após degradação com HCl 0,1M; (c) Solução após degradação com NaOH 0,1M



V.3.8 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA IANGAMBINA E EPI-IANGAMBINA

Após validação do método, avaliou-se sua aplicação para a quantificação dos dois epímeros nos extratos e fração de lignóides totais de *Ocotea duckei*.

A figura 59 (p. 158) mostra as curvas de calibração obtidas por sete concentrações (1,0-60 µg/mL) dos padrões de iangambina e epi-iangambina, com a determinação da equação da reta de regressão linear. Após injeção dos extratos e FLT, as áreas sobre os picos das lignanas foram relacionadas à equação, determinando-se a concentração dos marcadores no extrato etanólico bruto e fração de lignóides totais (Tabela 28, p. 159). A concentração encontrada está relacionada a uma injeção de 100 µg/mL, entretanto, para a preparação dessa solução, efetuou-se diluição a partir de uma solução estoque a 1mg/mL (100 µL SE + 900 µL FM). Assim, tem-se uma concentração 10 vezes maior das lignanas em 1mg do extrato e da fração. Essas informações estão demonstradas na Tabela 29, p.159.

Figura 59 – Curvas de calibração das duas lignanas para aplicação no estudo quantitativo

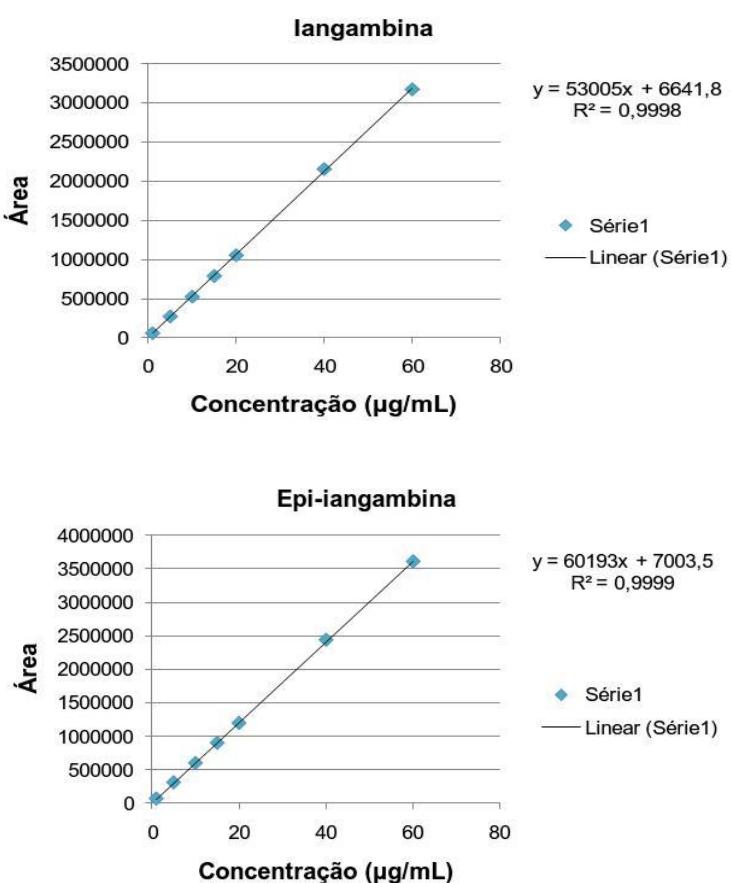


Tabela 28 – Resultados da quantificação da iangambina e epi-iangambina no extrato etanólico bruto (EEB) e fração de lignóides totais (FLT) de *O.duckei*

Amostras	Iangambina		Epi-iangambina	
	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
EEB F10	186229	3,39	256942	4,15
EEB A11	314464	5,81	542375	8,89
FLT F10	626224	11,69	803657	13,23
FLT A11	1007111,5	18,88	1511954	25,00

Tabela 29 – Quantidades em massa da iangambina (Ian) e epi-iangambina (Epi) nos extratos e frações de *O.duckei*.

Quantidades	EEB F10		EEB A11		FLT F10		FLT A11	
	Ian	Epi	Ian	Epi	Ian	Epi	Ian	Epi
Em 1,0 mg*	33,88	41,52	58,07	88,94	116,89	132,35	188,75	250,02
Em 1,0 g*	33,88	41,52	58,07	88,94	116,89	132,35	188,75	250,02
Total (mg)	75,4		147,01		249,24		438,77	
Rendimento ^a (%)	7,5		14,7		4,46		8,75	

* As quantidades em massa das lignanas em 1,0 mg do extrato ou fração estão na ordem de μg
Para 1,0 g do extrato ou fração, estão na ordem de mg

^a O rendimento foi calculado em relação ao total de IAN e EPI em 1,0g do extrato; para a FLT, considerou-se a melhor eficiência do processo de extração por ultrassom (59,57%)

Observa-se que há uma variação bastante grande nos teores dos epímeros nos extratos das duas coletas (F10 e A11), com o teor da epi-iangambina sendo mais de duas vezes maior para A11 que para F10, por exemplo. Considerando que os dois extratos tiveram o mesmo rendimento e foram submetidos ao mesmo

processo de extração, questiona-se sobre as possíveis variáveis que podem ter causado essa diferença nos teores: método de extração heterogêneo, período em que a planta foi coletada, local da coleta, estágio de maturação da planta, parte da planta coletada, entre outros. Assim, demonstra-se a importância de estudos de controle de qualidade das matérias-primas vegetais e padronização de extratos, de modo a obter a concentração dos marcadores em níveis constantes e bem definidos.

Conclusão

CONCLUSÃO

O estudo realizado com a iangambina e seu epímero, *epi*-iangambina, isolados de *Ocotea duckei* envolveu o desenvolvimento do método cromatográfico de análise, a validação do método proposto segundo a RE nº899/2003 da ANVISA, e quantificação simultânea dos marcadores nos extratos e frações. Um resumo dos experimentos desenvolvidos no projeto está demonstrado no Esquema 9, p.163.

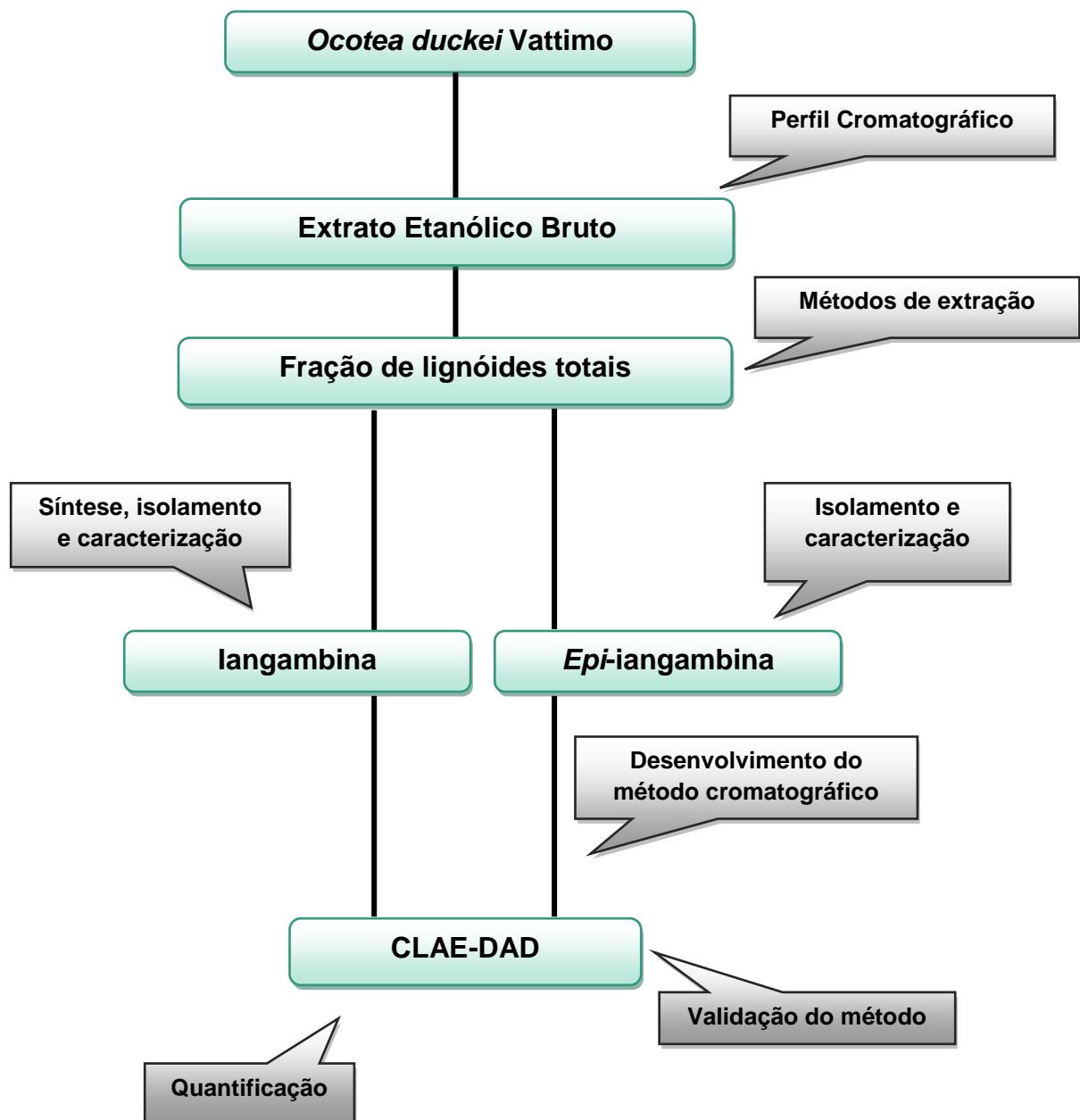
A proposta da rota de síntese estereoseletiva para a iangambina apresentou-se eficiente, com quatro etapas sintéticas, envolvendo reação de biotransformação enzimática através do uso de reagentes de origem natural.

A avaliação dos diferentes métodos de extração permitiu otimizar os procedimentos para obter as lignanas com maior rendimento possível. A comparação das fases e frações dos diferentes métodos permitiu estabelecer um maior rendimento dos epímeros na marcha de isolamento de lignóides, em extração por ultrassom, para obtenção da fração de lignóides totais (FLT).

O método cromatográfico desenvolvido em CLAE-DAD permitiu o isolamento das duas lignanas com bom grau de pureza, mostrando-se ser simples, rápido e eficiente para este fim. Através de técnicas espectroscópicas e termoanalíticas, foi possível caracterizar a iangambina e *epi*-iangambina do ponto de vista físico-químico. As substâncias apresentaram-se estáveis, frente a condições extremas de temperatura, pH e tempo de armazenamento.

O método desenvolvido apresentou excelentes resultados em relação aos parâmetros de validação analítica, com seletividade, linearidade, precisão e exatidão e robustez adequadas. A aplicação do método em estudo quantitativo permitiu determinar que, em 1,0g do EEB, contém cerca 58,07 mg de iangambina e 89,0 mg de *epi*-iangambina.

Esquema 9 – Mapa esquemático das atividades desenvolvidas durante o projeto



Referências

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N.; PACHÚ, C. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo. **Revista Ciência, Cultura e Saúde**, v.14, p. 7-10, 1995.
- ARAÚJO, I. A. **Beilschmiedia Nees (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro.** 1994. 59 f. Dissertação - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.
- AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. **Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties.** Cambridge University Press: Cambridge, 1990.
- BAITELLO, J. B. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, p. 445-450, 2001.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.
- BARBOSA- FILHO, J. M. **Lignanas, neolignanas e seus análogos.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. da UFSC, p.11-24, 2007.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, R. M.; DIAS, C. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; MEDEIROS, I. A. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 37-41, 2008.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS, L. C. S. L.; DA CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: Exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.
- BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 14, n. 3, p. 179-189, 1991.
- BARRETO, R. C. O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) no estado de Pernambuco. In: XXVI Congresso nacional de botânica. Brasília, Brasil. **Sociedade Brasileira de Botânica**, 1, p. 175-199, 1990

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, 2. ed., Viçosa, v. 1, p. 59-60, 2002.

BÁRTLOVÁ, M.; OPLETAL, L. R.; CHOBOT, V. R.; SOVOVÁ, H. Liquid chromatographic analysis of supercritical carbon dioxide extracts of *Schizandra chinensis*. **Journal of Chromatography B**, v. 770, n. 1–2, p. 283-289, 2002.

BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**. São Paulo, v.1, n.1, p. 14-17, 2005

BAZIN, M.-A.; KIHEL, L. E.; JOUANNE, M.; LANCELOT, J.-C.; RAULT, S. Synthesis of new avenalumic carboxamide derivatives in the ferulic series. **Synthetic Communications**, v. 38, n. 22, p. 3947-3959, 2008.

BERGERON, C.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.-L.; MAVI, S.; ROGERS, C.; HOSTETTMANN, K. Isolation of polyphenols from *Polygala gazensis* and liquid chromatography–Mass spectrometry of related African *Polygala* species. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 32-36, 1997.

BORTOLOMEAZZI, R.; VERARDO, G.; LIESSI, A.; CALLEA, A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 256-265, 2010.

BOWERS, W. S.; OHTA, T.; CLEERE, J. S.; MARSELLA, P. A. Discovery of insect anti juvenile hormones in plants. **Science**, v. 193, n. 4253, p. 542-547, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. – Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução nº 14, 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, abril de 2010

BRONZE UHLE, E. S. **Estudos sobre a síntese enantioseletiva de lignano-lactonas naturais.** 2007. 232 p. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415-421, 2004.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L. A.; CHAVES, M. C. O.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. A. Neolignans from plants in Northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 319-324, 2010.

CABRAL, M. M.; MARTINS MENDONÇA, P.; DA SILVA GOMES, C. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA DIAS, C.; SOARES, M. J.; DE CARVALHO QUEIROZ, M. M. Biological activity of yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 2, p. 249-255, 2007.

CARTER, G. T. Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 11, p. 1783-1789, 2011.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; CRUZ, H. N.; SILVA, C. L. M.; VIOLANTE, F. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; THOMAS, G.; MARTINS, M. A.; TIBIRIÇÁ, E. V.; NOEL, F.; CORDEIRO, R. S. B. Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and *in vitro* functional studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 101-105, 1995a.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ARAUJO, C. V.; MOREIRA, S.; BOZZA, P. T.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E. V. Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: *in vivo* pharmacological studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 106-112, 1995b.

CESAR, A. C. W. **Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi.** 79 p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2000

CHAO, Y. Y.; JAN, C. R.; KO, Y. C.; CHEN, J. J.; JIANN, B. P.; LU, Y. C.; CHEN, W. C.; SU, W.; CHEN, I. S. Effect of lignans isolated from *Hernandia nymphaeifolia* on estrogenic compounds-induced calcium mobilization in human neutrophils. **Life Sciences**, v. 70, n. 26, p. 3109-3121, 2002.

CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 9, p. 904-906, 1996.

CHIN, Y.-W.; CHAI, H.-B.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with antioxidant and cytoprotective activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7759-7764, 2008

COY-BARRERA, E. D.; CUCA-SUAREZ, L. E. In vitro anti-inflammatory effects of naturally-occurring compounds from two Lauraceae plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 83, p. 1397-1402, 2011.

COY-BARRERA, E. D.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; SEFKOW, M. PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1309-1314, 2009.

CUCA, L. E.; LEON, P.; COY, E. D. A bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, p. 179-181, 2009.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

DAVIN, L. B.; BEDGAR, D. L.; KATAYAMA, T.; LEWIS, N. G. On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3869-3874, 1992.

DAVIN, L. B.; WANG, H. B.; CROWELL, A. L.; BEDGAR, D. L.; MARTIN, D. M.; SARKANEN, S.; LEWIS, N. G. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. **Science**, v. 275, p. 362-366, 1997.

DIAS, A. F. An improved high-yield synthesis of Dehydrodieugenol. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 3008-3009, 1988.

DIAS, C. S. ; SILVA, I. G.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 62-63, 2003.

DIAS, C. S.; CRAVEIRO, A. A.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Óleo essencial das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, n. 6, p. 67-69, 2003a.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1069-1084, 2001.

DREWS, J. Drug discovery: A historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.

DUTRA, L. M.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. D. S.; NOGUEIRA, P. C. D. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; PRATA, A. P. D. N. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, n. 0, p. 115-118, 2012.

FAY, D. A.; ZIEGLER, H. W. Botanical source differentiation of *Podophyllum* resin by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 8, n. 8, p. 1501-1505, 1985

FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; SIMOES, C.; ALBARELLO, N.; TRUGO, L. C.; KAPLAN, M. A. C.; KRUL, W. R. Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. - Annonaceae. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 2, p. 121-124, 1999.

FUNASAKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae)**. 2006. 147 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, p. 407-411, 2009.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E. D.; SHIMABUKURO, A. A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1382-1386, 2005.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* - triatomine interactions. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 431-440, 2004.

GILBERT M, R. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: Past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, Supplement, p. S43-S49, 2008.

GOTTLIEB, O. R. Neolignans. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**. v. 35, p.1-72, 1978.

GOTTLIEB, O. R., Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.11, p. 1537-1570, 1972.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. **Lignans**. In: Rowe, J. W. Natural Products of Woody Plants: Chemical Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall. Springer-Verlag: Berlin, Cap. 7.3, p 439-511, 1989.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica. Brasilica.**, v. 17, n. 4, p.561-584, 2003.

HAUSOTT, B.; GREGER, H.; MARIAN, B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 10, p. 569-576, 2003.

HE, X.-G.; LIAN, L.-Z.; LIN, L.-Z. Analysis of lignan constituents from *Schisandra chinensis* by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 757, n. 1-2, p. 81-87, 1997.

HERBERT, J. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BARBOSA, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRICA, E. Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambin. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 1997.

HOFER, O.; SCHOLM, R. Stereochemistry of tetrahydrofurofuran derivatives - Circular-dichroism and absolute conformation. **Tetrahedron**, v. 37, n. 6, p. 1181-1186, 1981.

JESUS-MORAIS, C. M. Q.; ASSIS, E. F.; CORDEIRO, R. S. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, W. T.; SILVA, Z. L.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei* differentiates putative PAF receptor subtypes in the gastrointestinal tract of rats. **Planta Medica**, v. 66, n. 03, p. 211,216, 2000.

JUNG, J.-C.; KIM, J.-C.; MOON, H.-I.; PARK, O.-S. Stereoselective total synthesis of furofuran lignans through dianion aldol condensation. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 36, p. 6433-6437, 2006.

JUNG, K. Y.; LEE, I. S.; OH, S. R.; KIM, D. S.; LEE, H. K. Lignans with platelet activating factor antagonist activity from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 229-231, 1997.

JUNIOR, S. **Botânica fantástica: plantas da mitologia, religião, magia**. 1. ed. São Paulo: Brasiliense. 1984. 113p.

KATAYAMA, T., DAVIN, L. B., CHU, A., LEWIS, N. G. Novel benzylic ether reductions in lignan biogenesis in *Forsythia intermedia*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 581–59, 1993.

KAUR, P.; CHAUDHARY, A.; SINGH, B.; GOPICHAND. Optimization of extraction technique and validation of developed RP-HPLC-ELSD method for determination of terpene trilactones in *Ginkgo biloba* leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 1060-1064, 2009.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 1080 p.

KIM, J. Y.; LIM, H. J.; LEE, D. Y.; KIM, J. S.; KIM, D. H.; LEE, H. J.; KIM, H. D.; JEON, R.; RYU, J.-H. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 937-940, 2009.

KIM, J.-C.; KIM, K.-H.; JUNG, J.-C.; PARK, O.-S. An efficient asymmetric synthesis of furofuran lignans: (+)-sesamin and (-)-sesamin. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 1, p. 3-6, 2006.

KLEIN, T. LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256, 2008.

LACERDA, C. D. G. de. **Revisão dos alcalóides de Lauraceae e estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo.** 2004. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos).Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE.** Campinas: Ed. Átomo, 2009. 382 p.

LEE, S. B.; KIM, C. Y.; LEE, H. J.; YUN, J. H.; NHO, C. W. Induction of the phase II detoxification enzyme NQO1 in hepatocarcinoma cells by lignans from the fruit of *Schisandra chinensis* through nuclear accumulation of Nrf2. **Planta Medica**, v. 75, n. EFirst, p. 1314,1318, 2009.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LI, L.; YAN, J.; HU, K.; GU, J.; WANG, J.-J.; DENG, X.-L.; LI, H.; JING, X.; LI, Z.-Y.; YE, Q.-F.; OUYANG, D.-S. Protective effects of *Eucommia* lignans against hypertensive renal injury by inhibiting expression of aldose reductase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 454-461, 2012.

LI, L.-Q.; LI, J.; HUANG, Y.; WU, Q.; DENG, S.-P.; SU, X.-J.; YANG, R.-Y.; HUANG, J.-G.; CHEN, Z.-Z.; LI, S. Lignans from the heartwood of *Streblus asper* and their inhibiting activities to Hepatitis B virus. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 303-309, 2012.

LIM, C. K.; AYRES, D. C. High-performance liquid chromatography of aryltetrahydronaphthalene lignans. **Journal of Chromatography A**, v. 255, n. 0, p. 247-254, 1983.

LIMA, V. T. M. **Avaliação dos efeitos centrais da iangambina isolada de *Ocotea duckei* Vattimo: estudo comportamental e neuroquímico em córtex motor e corpo estriado de camundongo.** 2005. 189f. Tese (Doutorado em farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Non-alkaloidal constituents of *Virola elongata* bark. **Phytochemistry**, v. 24, p. 561-566, 1985.

MANSOOR, T. A.; RAMALHO, R. M.; RODRIGUES, C. M. P.; FERREIRA, M.-J. U. Dibenzylbutane and butyrolactone type lignans as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 5, p. 692-696, 2012.

MARCHESE, J. A.; BROETTO, F.; MING, L. C.; GOTO, R.; STEFANINI, M. B.; GALINA, A.; TEDESCO, Â. C.; CONTE, C.; MINIUK, C. M.; SCHURT, D. A.; SANGALETTI, E.; SILVA, G. O. D.; GOMES, G.; BERTAGNOLLI, J. A.; FRANCESCHI, L.; COSSA, M. L.; MORAES, M. R. D.; LIMA, P. M.; LIRA, R.; COSTA, S. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 332-335, 2004.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARQUES, R. C. P.; DE MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. D.; BARBOSA, J. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1-2, p. 117-120, 2003.

MASUNARI, A.; ISHIDA, E.; TRAZZI, G.; ALMEIDA, W. P.; COELHO, F. An alternative route to the synthesis of lignans intermediates. **Synthetic Communications**, v. 31, n. 14, p. 2127-2136, 2001.

MATEEVA, N. N.; KODE, R. N.; REDDA, K. K. Synthesis of novel flavonoid derivatives as potential HIV-integrase inhibitors. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1251-1258, 2002.

MATIAS, W. N. **Estudos térmicos e validação de metodologia analítica para a padronização de extratos vegetais de *Herissantia crispa* L Brizicky - Malvaceae** 2009. 102 f. Dissertação - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MESQUITA, L. M.; ROQUE, N. F.; QUINTANA, L. M. B.; PAULO, M. D.; BARBOSA, J. M. Lignans from *Rollinia* species (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 379-380, 1988.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.

MIYAZAWA, M.; ISHIKAWA, Y.; KASAHARA, H.; YAMANAKA I, J.; KAMEOKA, H. An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia fargesii*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 611-613, 1994.

MONTE NETO, R. L ; SOUSA, L. M. A. ; DIAS, C. S. ; BARBOSA FILHO, J. M. ;OLIVEIRA, M. R. Yangambin cytotoxicity: a pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 63, p. 681-686, 2008.

MONTE NETO, R. L.; BARBOSA, J. M.; SOUSA, L. M.; ATHAYDE, P. F.; DIAS, C. S.; OLIVEIRA, M. R. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 62c, p. 348-352, 2007.

MONTE-NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; FILHO, J. M. B.; OLIVEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215-221, 2011.

MORAIS, L. C. S. L.; PACHÚ, C. O.; SANTOS, V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. New lignan from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 6, p. 557, 1996.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57-61, 1998.

MORAIS, L. C. S. L.; PACHÚ, C. O.; SANTOS, V. L.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE FILHO; P., F. (+)-4'-O-demethylepimagnolin a from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 91-92, 1998a.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 2, p. 144-147, 1999.

MORETTO, L. D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**, v. 4, p. 4-48, 2000.

MORI, N.; WATANABE, H.; KITAHARA, T. Simple and efficient asymmetric synthesis of furofuran lignans yangambin and caruilignan A. **Synthesis**, n. 3, p. 400-404, 2006.

MORI, N.; WATANABE, H.; KITAHARA, T. Simple synthesis of enantiomerically pure sauriols A and B. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 7, p. 1750-1753, 2006a.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

NARANJO, P., KIJJOA, A., GIESBRECHT, A. M., GOTTLIEB, O.R. *Ocotea quixos*, American cinnamon. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 4, p. 233-236., 1981

NASCIMENTO, T. G. **Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação simultânea de fármacos em plasma humano**. 2004. 248 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

NEGI, A. S.; CHATTOPADHYAY, S. K.; SRIVASTAVA, S.; BHATTACHARYA, A. K. A simple regioselective demethylation of p-aryl methyl ethers using aluminum chloride-dichloromethane system. **Synthetic Communications**, v. 35, n. 1, p. 15-21, 2005.

ORTET, R.; PRADO, S.; REGALADO, E. L.; VALERIOTE, F. A.; MEDIA, J.; MENDIOLA, J.; THOMAS, O. P. Furfuran lignans and a flavone from *Artemisia gorgonum* Webb and their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 637-640, 2011.

PACHÚ, C. O.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Atividade depressora do sistema nervoso central pela iangambina. **Revista Ciência Cultura e Saúde**, v.12, p. 14-16, 1993.

PAN, J. X.; HENSENS, O. D.; ZINK, D. L.; CHANG, M. N.; HWANG, S. Lignans with platelet activating factor antagonist activity from *Magnolia biondii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, 1987.

PAN, J. Y.; CHEN, S. L.; YANG, M. H.; WU, J.; SINKKONEN, J.; ZOU, K. An update on lignans: Natural products and synthesis. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 10, p. 1251-1292, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3. ed. [s.l.]: Thomson Learning, 2001.

PELTER, A.; WARD, R. S.; JONES, D. M.; MADDOCKS, P. Asymmetric synthesis of dibenzylbutyrolactones and aryltetralin lignan lactones by tandem conjugate addition to a chiral butenolide. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 21, p. 2621-2629, 1993.

PENHA, A. R. S. **Estudo da potencialidade da lignana langambina e da Quitosana no tratamento da Leishmaniose experimental em camundongos suíços**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

PEREIRA, C. G. **Processos de obtenção de extratos e substâncias bioativas** In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais. 1^a ed. Ouro Preto/MG: Editora UFOP, 2011. 252p.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; CHAO, D.; HERRERA, P.; MARTI, M. P. Leaf oil of *Licaria triandra* (Sw.) Kostermans. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 4, p. 382-383, 2005

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.45-61, 2002.

QUEIROGA, K. F. **Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação da riparina I em sangue de ratos**. 2010. 163 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUIDEAU, S.; RALPH, J. Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and p-coumaryl alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1108-1110, 1992

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. Lauraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000143>>.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. Lauraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008440>>.

RAMANJANEYULU, K.; RAO, B. V.; RAO, T. B. Synthesis and bioactivity evaluation of cinnamic acid esters from *Oxalis pes-caprae*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 589-594, 2011

RAMOS, C. S. **Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae**. 2006. 246 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2006.

RANDAU, K. P.; MEIRA, J. L.; FARIAS BRAGA, J. M.; MONTEIRO, D. B.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) – Matéria-Prima. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.

RENTSCH, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, p. 1-9, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, R.; CARVALHO, F. A. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E. V. Protective effect of yangambin-a naturally occurring platelet activating factor (PAF) receptor antagonist on anaphylactic shock in rats. **Phytomedicine**, v. 3, p. 249-256, 1996.

RÍOS, J. L.; GINER, R. M.; PRIETO, J. M. New findings on the bioactivity of lignans. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 26, Part G, p.183-292, 2002

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1993, p. 336-391.

SANTOS, J. S. **Levantamento etnobotânico da flora medicinal do município de Tacaratu, Pernambuco**. Monografia (Especialização em Programação do Ensino de Biologia)– Faculdade de Formação de Professores de Garanhuns, Universidade de Pernambuco, Garanhuns. 2002.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 57, n. 7, p. S3-S9, 2008.

SEO, S. M.; LEE, H. J.; LEE, O. K.; JO, H. J.; KANG, H. Y.; CHOI, D. H.; PAIK, K. H.; KHAN, M. Eurofuran lignans from the bark of *Magnolia kobus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 4, p. 419-423, 2008.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O.; PEREIRA, A. P. B.; LIMA, M. C. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Anti-allergic properties of natural PAF antagonist yangambin. **Planta Medica**, v.63, p. 207-212, 1997.

SHEN, T. Y.; HWANG, S. B.; CHANG, M. N.; DOEBBER, T. W.; LAM, M. H. T.; WU, M. S.; WANG, X.; HAN, G. Q.; LI, R. Z. Characterization of a platelet activating factor receptor antagonist isolated from Haifenteng (*Piper-Futokadsura*) – Specific inhibition of *In vitro* and *In vivo* platelet activating factor induced effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 3, p. 672-676, 1985.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, n. 0, p. 10-23, 2012.

SILVA, I. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; LACERDA, C. D. G.; CUNHA, E. V. L. Coelaureine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 9, p. 881-883, 2002.

SILVA, J. R. A.; DO CARMO, D. F. M.; REIS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DA SILVA, B. O.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA, W. D.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 661-662, 1989.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileiras de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3^a ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2010. 957 p.

SOUSA, F. C. F.; LIMA, V. T. M.; LACERDA, C. D. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 282-286, 2005.

SRIVASTAVA, S.; GUPTA, M. M.; PRAJAPATI, V.; TRIPATHI, A. K.; KUMAR, S. Sesamin a potent antifeedant principle from *Piper mullesua*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 70-72, 2001.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.

STARMANS, D. A. J.; NIJHUIS, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 191-197, 1996.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas - Biofarmacotécnica**. 1^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (RJ), 2009.

SUGINOME, H.; ISHIKAWA, M.; YORITA, K.; SHIMOYAMA, N.; SASAKI, T.; ORITO, K. Photoinduced molecular transformations. 157. A new stereo and regioselective synthesis of 2,6-Diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane lignans involving a beta scission of alkoxy radicals as the key step. New total syntheses of (.-)-sesamin, (+)-eudesmin, and (++)-yangambin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 3052-3064, 1995

SUNAZUKA, T.; HIROSE, T.; OMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 2, p. 302-314, 2008.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M. Stereochemical diversity in lignan biosynthesis of *Arctium lappa* L. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 6, p. 1262-1269, 2002.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 4, p. 273-284, 2007.

TELES, M. M. R. S. **Estudo fitoquímico de Ocotea duckei Vattimo (Lauraceae)**. 2012. 145 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

TIBIRIÇÁ, E. Cardiovascular properties of yangambin, a lignan isolated from brazilian plants. **Cardiovascular Drug Reviews**, v.19, n.4, p.313-328, 2001.

TIBIRIÇÁ, E. V.; MOSQUERA, K.; ABREU, M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, F. A. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B. Antagonistic effect of yangambin on platelet activing factor (PAF)-induced cardiovascular collapse. **Phytomedicine**, v. 2, p. 235-242, 1996.

UMEZAWA, T.; OKUNISHI, T.; SHIMADA, M. Stereochemical diversity in lignan biosynthesis. **Wood Research**, v. 84, p 62–75, 1997.

UMEZAWA, T. Phylogenetic distribution of lignan producing plants. **Wood Research**, v. 90, p. 27-110, 2003

VALENTINI, S. R.; SOMMER W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos Mudi**, v. 11, n. 2, p.26-31, 2007.

VILEGAS, J. H. Y; GOTTLIEB, O. R; KAPLAN, M. A. C; GOTTLIEB, H. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3577-3578, 1989.

WANG, C. C.; CHEN, S.; WU, T. S. The facile reversed-phase HPLC resolution of tetrahydrofurofuran nucleus lignans in traditional Chinese medicine: Quantitative analysis of asarinin and sesamin in *Asari radix*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 50, n. 2, p. 261-266, 2003.

WARD, R. S. Different strategies for the chemical synthesis of lignans. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, n. 3, p. 391-400, 2003.

WEI, W.; LI, X.; WANG, K.; ZHENG, Z.; ZHOU, M. Lignans with anti-hepatitis B virus activities from *Phyllanthus niruri* L. **Phytotherapy Research**, 2011.

WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.78, n. 2, p. 377-387, 1991.

WHO. The World medicines situation 2011: Traditional medicines: Global situation, issues and challenges. **World Health Organization**, Geneva, 2011.

WINTER, J. M.; TANG, Y. Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, 2012. *In press*

WINTERFELDT, E. Applications of diisobutylaluminum hydride (DIBAL-H) and triisobutylaluminum (TIBA) as reducing agents in organic synthesis. **Synthesis-Stuttgart**, n. 10, p. 617-630, 1975.

XIA, Z. Q.; COSTA, M. A.; PELISSIER, H. C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning, and functional expression - Implications for human health protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12614-12623, 2001.

XIAO, W. L.; WANG, R. R.; ZHAO, W.; TIAN, R. R.; SHANG, S. Z.; YANG, L. M.; YANG, J. H.; PU, J. X.; ZHENG, Y. T.; SUN, H. D. Anti-HIV-1 activity of lignans from the fruits of *Schisandra rubriflora*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 5, p. 697-701, 2010.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, p. 92-98, 2007.

ZHAO, L.; TIAN, X.; FAN, P.-C.; ZHAN, Y.-J.; SHEN, D.-W.; JIN, Y. Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 2, p. 168-177, 2008.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S. E.; PAULUS, K.; BAUER, R.; VAN STADEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 219-230, 2000.