

ANTONILÊNI FREIRE DUARTE MEDEIROS

APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA
EFICIÊNCIA PREPARATIVA PARA ISOLAMENTO DE ALCALOIDES
DE *Cissampelos sympodialis* Eichl. E ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA
PRELIMINAR DE WARIFTEÍNA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

JOÃO PESSOA/PB

2013

ANTONILÊNI FREIRE DUARTE MEDEIROS

APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA
EFICIÊNCIA PREPARATIVA PARA ISOLAMENTO DE ALCALOIDES
DE *Cissampelos sympodialis* Eichl. E ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA
PRELIMINAR DE WARIFTEÍNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da
Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento
às exigências para a obtenção do título de Doutora
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

JOÃO PESSOA/PB

2013

M488a Medeiros, Antonilêni Freire Duarte.

Aplicação de cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e estudo de farmacocinética preliminar de Warifteína / Antonilêni Freire Duarte Medeiros.- João Pessoa, 2013.

167f. : il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. CLAE-PREP. 3. Espectrometria de massas. 4. *Cissampelos sympodialis*. 5. Warifteína. 6. Cinética.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ANTONILÊNÍ FREIRE DUARTE MEDEIROS

APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA
EFICIÊNCIA PREPARATIVA PARA ISOLAMENTO DE
ALCALOIDES DE *Cissampelos sympodialis* Eichl. E ESTUDO DE
FARMACOCINÉTICA PRELIMINAR DE WARIFTEÍNA

Aprovado em: 29 / 08 / 2013

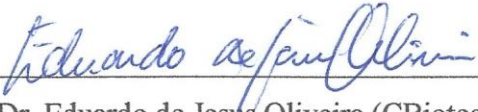
COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Bárbara Viviana Oliveira Santos
(CCS/DCS-UEPB)

Prof. Dr. Luis César Rodrigues
(CBiotec-UEPB)

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
(CCS/DCF-UEPB)

Prof. Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura
(CCS/DFARM-UFRN)


Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (CBiotec-UEPB)
(Orientador)

Aos meus pais, *Antonio* e *Leni* que sempre acreditaram e investiram no meu crescimento profissional.

A *Ricardo*, que caminhou comigo em mais uma jornada.

Dedico.

Agradecimentos

Ao Mestre do Universo regente das forças que impulsionam nossas vidas.

Aos meus pais, Antonio e Leni, que sempre fizeram tudo para a minha formação e de meus irmãos, acreditando que a herança maior que podem nos legar são os estudos.

Aos meus irmãos, Antoniana, Benedito e Vitor, além de Selma, que sempre torceram por mim.

Ao meu esposo, Ricardo Melo, pelo amor, apoio e compreensão incondicionais quando eu quase desisti por tantas vezes... Pelo incentivo, palavras de carinho e sacrifícios em tantos momentos.

Aos meus familiares “Freire”, “Duarte” e “Medeiros”, tios, tias, padrinhos, primos...

À minha família agregada, “Os Almeida de Melo” que sempre me incentivaram e apoiaram: Dona Lia, Márcia Melo e Paulo Andrade, Aroldo Melo e Audicéia Souza, Mércia Melo e Amaro Lira (que me aguentaram e apoiaram nas idas e vindas!), Marcus Vinícius Melo, além dos seis sobrinhos, Aroldinho, Artur, Lucas, Camila, e os pequenos João e Pedro.

Ao meu orientador, Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, pela orientação e demais ensinamentos prestados tanto de forma acadêmica quanto para a vida, pela sua paciência, atenção, além de seu exemplo como mestre, sua integridade e ética profissional, que ficarão marcadas como modelo a seguir.

À professora Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva pelo apoio e brilhante colaboração; e sua excelente equipe, em especial Natalia Ramos, pelo companheirismo.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelos ensinamentos.

À banca examinadora deste trabalho, professores Bárbara, Luis Cézar, Túlio e Fábio.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela gestão do programa e esforço na manutenção de sua qualidade, professora Dra. Fátima Agra.

À secretária e amiga do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Caroline Medeiros, que sempre nos acalmou nos momentos de apertado, além de ter sempre a resposta para nossas dúvidas burocráticas!

À Universidade Federal da Paraíba, ao Centro de Ciências da Saúde, ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela oportunidade de aprendizado.

Aos amigos da turma de doutorado 2009 e dos laboratórios de Fitoquímica, **Denise Aline Casimiro, Marianne Guedes**, Fabiana, Analúcia Guedes, Jacqueline, Ana Sílvia Suassuna, Yanna Teles, Ísis Fernandes, Camila “Carioca”, Steno e Camila Holanda, Jéssica Celestino, Jéssica

Maciel, Daysianne Uchoa, Sandro Leal, Fábila Rossetti, e todos os outros que de alguma forma estiveram no mesmo caminho...

Às amigas “LAFAMnetes”! Pelo convívio e ajuda diários, pela amizade cativada a cada dia de trabalho, nos cafezinhos de manhã e fim de tarde no laboratório! Vocês ajudaram, e muito, na realização desse trabalho, não só quando era para “colocar a mão nos ratos”, mas no apoio e incentivo sempre. Vocês, Aline, Ingrid, Eugênia, Michelline, Ayala, Lídia, Juliane, todas foram muito importantes, e ótimas!!!

Ao amigo Rony, por sua preocupação, atenção, apoio e amizade.

Aos técnicos de laboratório, maravilhosos, sem vocês, tudo seria mais difícil, José Crispim Duarte, Gil e Nonato Silva Filho; e também, Brizola, Irene e Dena.

Ao técnico e amigo farmacêutico, Alexsandro Marinho, por sua ajuda em vários momentos desse trabalho, e no compartilhamento de experiências de laboratório, além de seu apoio com os dados da Milona e fornecimento de material também.

A todos os funcionários do antigo LTF, CBIotec e do apoio.

Aos amigos que sempre torceram por mim e ficaram ausentes de minha presença tantas vezes! Carola Alonso, Cristina Helena e Antonio Neto, Lili e Luciano Holanda de Souza, Betânea Lira.

Aos amigos do CT/UFPB: Geraldo e Kellen, Givanildo e Aline, Roberto, Gilson, Clóvis, pela torcida e apoio!

A família Balbino: Fabiane e suas seis irmãs! E sua matriarca Fátima, pelo carinho, apoio e amizade.

Aos amigos do Centro Universitário de João Pessoa/UNIPÊ, Karla Albuquerque, Vera Lúcia Pérez, Elisângela Antunes, Lucivânia Silva, Danielle Nunes, Vanduir Soares Filho, Myriam, Catarina, Sandra Sorage, Maria Sandra, Maria do Carmo, Luciana, Patrícia Araruna, Érika Nóbrega, Suzy Desirée, Pedro, e todos que fazem a enfermagem! Maria Elma, Ana Delgado, Alba Tavares, Washington, Ligiane e todos que fazem a fisioterapia! Ana Karina Fahning, Ruth, Tacyana, Artemísia, Edvany (minha fono querida!) e todos que fazem a fonoaudiologia! Zezita Matos (nossa Dama do Teatro paraibano!), Roberta, Graça e equipe do NAPE, com vocês, aprendi e aprendo a ser mais professora! À equipe de apoio, Joselito, Vânia, Penha, Clodoaldo, Danilo. Enfim, todos que fazem essa Instituição de Ensino! Além de claro, meus queridos alunos, em especial minha monitora Danielle Rodrigues!

Mensagem

É preciso resistir!

É preciso resistir.

Como as árvores e as montanhas, que suportam os mais inesperados ventos.

Muitas vezes, o homem precisa fingir que não ouve; ou deixar que a mágoa encontre, em seu coração, o túbulo silencioso.

É necessário acreditar.

Mesmo quando os fatos o negam, quando o sofrimento é a recompensa, é preciso lutar por aquilo em que se acredita. Pois, para aquele que retorna a meio caminho, de nada valeram os sacrifícios da jornada.

Mesmo quando a vida parece um fardo, quando de todos os lados a tristeza faz sentir a sua presença, é necessário seguir. E da fraqueza extrair forças, para um dia alcançar a felicidade.

Por isto, não deveis desesperar ao ver ruírem os vossos castelos; antes buscai erguê-los novamente!

Muitas vezes, a diferença entre o fracasso e o sucesso é uma tentativa a mais...

E não é sábio aquele que maldiz o seu destino, ou por ele se incrimina, e sim o que se esforça para torná-lo melhor!

Em qualquer situação, mais vale uma canção de esperança que palavras de amargor. Pois a angústia não trará soluções aos vossos problemas; antes os fará parecer maiores, roubando-vos a coragem com que os poderíeis resolver.

E, por certo, não é com a amargura de hoje que ireis construir um doce amanhã.

Meditai sempre, sobre os vossos problemas. Pois é junto ao vosso verdadeiro Eu que encontrareis as melhores respostas!

Lembraí-vos que a cada taça de fel corresponde uma taça de mel. Porém, não sentireis o sabor do mel que a vida coloca em vossos lábios, se o vosso paladar se obstina em ater-se ao fel...

E assim procede quem apenas enxerga as dificuldades da vida, desprezando as dádivas que recebe a cada dia. Pois a quem distribui o fel, dificilmente será ofertado o mel!

Por isto, deveis resistir à amargura. Assim encontrareis, em vosso verdadeiro eu, a força de que necessitais para construir o vosso futuro!

E a vossa felicidade!

(FONTE: <http://www.minutodesabedoria.com.br>)

*“Education is what you have left when you have
forgotten everything you learned in school.”*

Albert Einstein

MEDEIROS, A. F. D. **Aplicação de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa para Isolamento de Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e Estudo de Farmacocinética Preliminar de Warifteína.** Tese (Doutorado). 167 p. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2013.

RESUMO

A aplicação da cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa (CLAE-PREP) no isolamento de produtos naturais, mostra-se como uma técnica robusta, versátil e rápida, que garante a purificação e o isolamento de substâncias de matrizes complexas, como os produtos naturais. Essa técnica é uma ferramenta valiosa numa área em que a purificação e obtenção de amostras em quantidade é algo laborioso, e muitas vezes, há necessidade de reisolamento de amostras; assim, sua reprodutibilidade é uma grande vantagem. A combinação da CLAE com a espectrometria de massas permite unir as vantagens da cromatografia, como a alta seletividade e eficiência de separação, às vantagens da espectrometria de massas, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade. *Cissampelos sympodialis* Eichl. é uma espécie da flora brasileira, a infusão das raízes da planta é popularmente utilizada no nordeste do Brasil para tratamento de asma, bronquite e reumatismo, dentre outras enfermidades inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido e reprodutível para o isolamento dos marcadores químicos estabelecidos e de outros alcaloides de *C. sympodialis* Eichl., e utilizar o padrão de warifteína para quantificação da mesma em fluidos biológicos com vistas à determinação de parâmetros farmacocinéticos do alcaloide após administração *in vivo* em ratos. O método cromatográfico utilizado consistiu em gradiente de 0-15 min (75 %), 15-20 min (80 %), 20-25 min (100 %), λ de 278 nm, fluxo de 5,0 mL/min e tempo de corrida de 20 min, com fase móvel de metanol e água, ambos basificados com amônia para pH 8,0 e a massa de FATT-rz injetada por cada corrida cromatográfica na coluna foi 800 mg. Foram isolados os alcaloides warifteína (pureza 99,79%), metil-warifteína (pureza 98,52%), os epímeros de desmetil-roraimina, além de um alcaloide inédito na literatura que teve sua estrutura elucidada e foi denominado de Sousina. Animais da espécie *Ratus wistar* receberam dose única de 1,0 mg/Kg de warifteína intravenosa e as coletas de sangue foram realizadas nos tempos 5, 15, 30, 60, 120 e 180 min. As amostras sangue foram centrifugadas para obtenção do plasma e extraídas por precipitação de proteínas utilizando acetonitrila. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática versus tempo pelo modelo não-compartimental. A faixa de linearidade para o método cromatográfico foi entre 10 e 500 ng/mL e os parâmetros cinéticos foram $C_{\text{máx}}$ 16,08 $\mu\text{g/mL}$, $T_{\text{máx}}$ 12,5 min^{-1} , K_{el} 0,01355 min^{-1} . O método de isolamento por CLAE-PREP é uma alternativa prática, rápida e robusta para obtenção dos alcaloides de *C. sympodialis*. O método proposto por CLAE-EM/EM permitiu quantificar a warifteína em fluido plasmático de rato com a extração das amostras por precipitação de proteínas, ainda, houve grande variabilidade interindividual entre os animais usados no experimento cinético.

Palavras-chave: CLAE-PREP. Espectrometria de massas. *Cissampelos sympodialis*. Warifteína. Cinética.

MEDEIROS, A. F. D. **Aplicação de cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e estudo de farmacocinética preliminar de warifteína.** Tese (Doutorado). 167 p. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2013.

ABSTRACT

The application of preparative high pressure liquid chromatography (PREP-HPLC) in the isolation of natural products is shown as a robust, versatile and fast technique that ensures the purification and isolation of substances in complex matrices, as natural products. This technique is a powerful tool in an area in which purification and obtainment of samples in large amount is somewhat laborious, and often, there is a need for re-isolation of samples; thus, its reproducibility is a great advantage. The combination of HPLC with mass spectrometry allows merging the advantages of chromatography, such as the high selectivity and separation efficiency, with the mass spectrometry advantages, as information related to molecular structure, the molar mass and enhancement of additional selectivity. *Cissampelos sympodialis* Eichl. is a Brazilian species and the infusion of this plant is traditionally used in the northeast of Brazil to treat asthma, bronchitis and rheumatism, between other inflammatory diseases. The objective of this work to develop a rapid and reproducible method for isolation of established chemical biomarkers of plant and other alkaloids from *C. sympodialis* Eichl., and use the standard of warifteine in quantification of it in biological fluids to determine the pharmacokinetic parameters of the alkaloid after administration of it in rats *in vivo*. The chromatographic method consisted of a gradient from 0-15 min (75 % B), 15-20 min (80 % B), 20-25 min (100 % B), λ 278 nm, and flow of 5.0 mL/min during 20 min, with mobile phase of methanol (B) and water (A) basified with ammonium to reach pH 8.0, and the amount of sample mass injected per experiment was 800 mg. The alkaloids isolated were warifteine (99.79 % of purity), methyl-warifteine (98.52 % of purity), the mixture of epimers of desmethyl-roraimine, and a new alkaloid not referred in literature that was elucidated and named as Sousine. Animals from *Ratus norvegicus* species received an intravenous single dose of warifteine of 1.0 mg/Kg, and the blood samples were collected in 5, 15, 30, 60, 120 and 180 minutes. The blood samples were centrifuged to obtain the plasma and then were extracted by protein precipitation with acetonitrile. The pharmacokinetic parameters were calculated based on plasmatic concentrations versus time curves using non-compartmental model. The linearity range to chromatographic method was between 10 and 500 ng/mL e the kinetic parameters were $C_{\text{máx}}$ 16.08 $\mu\text{g/mL}$, $T_{\text{máx}}$ 12.5 min^{-1} , K_{el} 0.01355 min^{-1} . The method developed to isolation of alkaloids from *C. sympodialis* Eichl. is a practical, rapid and robust one. The HPLC-MS/MS method enabled to quantify warifteine in rat plasma with samples extraction by protein precipitation, yet, there was a great variability between animals in the kinetics experiment.

Key words: PREP-HPLC. Mass Spectrometry. *Cissampelos sympodialis*. Warifteine. Pharmacokinetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos das espécies <i>Cissampelos glaberrima</i> A.St.-Hil., <i>Cissampelos ovalifolia</i> DC., e <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	28
Figura 2 – Esquema básico de um sistema de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência	37
Figura 3 – Esquema representativo de um sistema de espectrometria de massas ESI/EM-EM com triplo quadrupolo e fonte de ionização eletrospray.	42
Figura 4 – Procedimento de extração líquido-líquido	48
Figura 5 – Procedimento de extração por precipitação de proteína	49
Figura 6 – Procedimento de extração em fase sólida	51
CAPÍTULO I	
Figura 7 Esquema de marcha sistemática para isolamento da fração alcaloides terciários totais de <i>Cissampelos sympodilais</i> Eichl.	62
Figura 8 Esquema de marcha sistemática para isolamento da fração alcaloides terciários totais de <i>Cissampelos sympodilais</i> Eichl.	63
Figura 9 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. em coluna analítica de fase reversa com sistema de eluição metanol e água, em gradiente 0 a 5 min (10 %), 5 a 15 min (20 %), 15 a 20 min (40 %), 20 a 25 (60 %), 25 a 30 (80 %), 30 a 33 min (100 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 20,64 min.	65
Figura 10 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. em coluna analítica com sistema de eluição metanol e água, em gradiente 0 a 5 min (40 %), 5 a 15 min (60 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 (90 %), 25 a 30 (100 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 22,01 min.	66
Figura 11 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. em coluna analítica de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 5 min (60 %), 5 a 15 min (72 %), 15 a 25 min (80 %), 25 a 30 (60 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 9,96 min; Tr (m-WAR) 12,9 min.	67
Figura 12 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. em coluna preparativa de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 15 min (75 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 min (100 %), volume de injeção 500 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 10,81 min; Tr (m-WAR) 15,03 min.	68
Figura 13 – Ampliação do cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. em coluna preparativa de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 15 min (75 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 min (100 %), volume de injeção 500 µL, λ máximo 280 nm, com os picos isolados incluindo a warifteína (6) e metil-warifteína (8).	70

Figura 14 – Análise de pureza para o pico de warifteína realizada em CLAE-UV/DAD com detalhes da variação da faixa de comprimento de onda em A1, curva de perfil de pureza em A2 e absorções do espectro de ultravioleta em A3.	71
Figura 15 – Análise de pureza para o pico da metil-warifteína realizada em CLAE-UV/DAD com detalhes da variação da faixa de comprimento de onda em B1, curva de perfil de pureza em B2 e absorções do espectro de ultravioleta em B3.	72
Figura 16 Esquema de marcha sistemática para isolamento dos alcaloides warifteína e metil-warifteína de <i>Cissampelos sympodilais</i> Eichl.	74
Figura 17 – Estrutura do alcaloide warifteína	76
Figura 18 – Estrutura do alcaloide Metil-warifteína	77
Figura 19 – Estruturas dos alcaloides Des-7'-O-metilroraimina e Epi-des-7'-O-metilroraimina	78
Figura 20 – Espectro de massas de baixa resolução para warifteína	80
Figura 21 – Espectro de massas de baixa resolução para metil-warifteína	81
Figura 22 – Espectro de massas de baixa resolução para a mistura Des-7-O-metilroraimina e Epi-des-7'-O-metilroraimina	82
Figura 23 – Estrutura proposta para o alcaloide inédito CS5 – Sousina	87
Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 0 a 12 ppm	89
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 6,0 a 9,0 ppm	90
Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 4,0 a 5,0 ppm	91
Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 3,0 a 4,0 ppm	92
Figura 28 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 2,0 a 3,0 ppm	93
Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 1,0 a 2,0 ppm	94
Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 0 a 220 ppm	95
Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 100 a 160 ppm	96
Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 20 a 75 ppm	97
Figura 33 – Espectro de RMN de HSQC para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 1,5 a 7,5 ppm	98
Figura 34 – Espectro de RMN de HMBC para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 1,0 a 7,5 ppm	99
Figura 35 – Espectro de massas para Sousina	100
CAPÍTULO II	
Figura 36 – Esquema de infusão pós-coluna	108
Figura 37 – Representação de técnica de coleta de sangue de rato por punção cardíaca	111

Figura 38 – Representação de técnica de contenção de rato usando aparato de contenção para venopunção e administração de substância na veia caudal	115
Figura 39 – Passo a passo da venopunção em cauda de rato para administração de warifteína	116
Figura 40 – Espectros de massas para o íon pai da warifteína m/z 593,366, na concentração de 1 ng/mL	120
Figura 41 – Espectros de massas para o íon filho da warifteína (m/z 489,293), na concentração de 1 ng/mL	121
Figura 42 – Espectro de massas para o íon pai (m/z 607,540) da metil-warifteína na concentração de 1 ng/mL.	123
Figura 43 – Espectro de massas para o íon filho (m/z 503,380) da metil-warifteína na concentração de 1 ng/mL	124
Figura 44 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostra de warifteína em solução nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, (A e B, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.	126
Figura 45 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostra de metil-warifteína em solução nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, (A e B, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.	127
Figura 46 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostras de sangue de ratos fortificadas com warifteína e extraídas com acetonitrila nas concentrações de 1 e 10 ng/mL e branco (A, B e C, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.	128
Figura 47 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína extraída de sangue de ratos na concentração de 10 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 1,94 min, fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	131
Figura 48 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína extraída de sangue de ratos na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 1,94 min, fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	131
Figura 49 – Estrutura do alcaloide isoquinolínico papaverina	132
Figura 50 – Espectro de massas para o íon filho (m/z 324,214) da papaverina na concentração de 10 ng/mL	133
Figura 51 – Cromatograma de injeção de amostra de papaverina em solução na concentração de 10 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 2,45 min, fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	134
Figura 52 – Cromatograma de injeção de amostras de warifteína e papaverina em solução na concentração de 5,0 ng/mL em sistema CLAE-EM, fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).1	134
Figura 53 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₁₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	135
Figura 54 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	136

Figura 55 – Cromatograma de injeção de amostra de papaverina em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	136
Figura 56 – Cromatograma de injeção de amostras de warifteína e papaverina extraídas de sangue de rato nas concentrações de 500 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente, em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	137
Figura 57 – Gráfico de resíduos e de concentração versus resposta de warifteína para a faixa de concentração de linearidade de amostras extraídas de plasma de rato	140
Figura 58 – Espectro de avaliação de efeito matriz warifteína em amostra biológica de sangue de rato em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₁₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	141
Figura 59 – Espectro de avaliação de efeito matriz warifteína em amostra biológica de sangue de rato extraído em cartão <i>Dry Blood Spot</i> , em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₁₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	142
Figura 60 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos, em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	143
Figura 61 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com hexano 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	144
Figura 62 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com clorofórmio 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	146
Figura 63 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com MTBE 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C ₈ , fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	148
Figura 64 – Cromatograma de injeção de warifteína na concentração de 200 ng/mL preparada com a mesma fase móvel de injeção (acetonitrila e água na proporção de 60:40, respectivamente) em sistema CLAE-EM/EM, com coluna de fase reversa C ₈ e C ₁₈ (A e B, respectivamente), fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (60:40:0,2, v/v).	151
Figura 65 – Cromatograma de injeção de warifteína na concentração de 200 ng/mL preparada com a mesma fase móvel de injeção (acetonitrila e água na proporção de 80:20, respectivamente) em sistema CLAE-EM/EM, com coluna de fase reversa C ₈ e C ₁₈ (A e B, respectivamente), fase móvel ACN:H ₂ O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).	153

Figura 66 – Gráfico de concentração plasmática média ($\mu\text{g/mL}$) em função do tempo (minutos) de warifteína administrada na dose de 1,0 mg/Kg em ratos por via intravenosa (cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 animais). 157

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Alguns alcaloides isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	29
Quadro 2 – Alcaloides isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. e suas atividades farmacológicas	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre técnicas de extração de amostras	52
Tabela 2 – Métodos de quantificação de alcaloides em matriz biológica relatados na literatura	53
CAPÍTULO I	
Tabela 3 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	64
Tabela 4 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	65
Tabela 5 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	66
Tabela 6 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 20 minutos em sistema CLAE-PREP de fase reversa com amostra de FATT-rz de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	68
Tabela 7 – Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN para ¹³ C e ¹ H (CDCl ₃ , 75 e 300 MHz, δ em ppm) para o alcaloide Sousina isolado de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	88
CAPÍTULO II	
Tabela 8 – Parâmetros de espectrometria de massas de baixa resolução para a warifteína	122
Tabela 9 – Parâmetros de espectrometria de massas de baixa resolução para a metil-warifteína	125
Tabela 10 – Parâmetros farmacocinéticos para warifteína administrada intravenosamente em ratos	157

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS _{0-T}	Área sob a curva do tempo zero ao último tempo com concentrações mensuráveis
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (Ionização à Pressão Atmosférica)
APORF.	Aporfínicos
ASC	Área sob a curva
ASC _{0-∞}	Área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito
AUC _{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao último tempo
BBI	Bisbenzilisquinolínico
BI	Benzilisquinolínico
BIOFITO	Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica
CC	Cromatografia em Coluna
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-EM	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-EM/EM-ESI	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray
CLAE-FLU	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de Fluorescência
CLAE-PREP	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa
CLAE-PREP UV/DAD	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa Ultravioleta/Detector de Arranjo de Diodo
CLAE-UV	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta
CLAE-UV/DAD	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência- Ultravioleta/Detector de Arranjo de Diodo
CL-EM-EM	Cromatografia a Líquido acoplada à Espectrometria de Massas
C _{máx}	Concentração plasmática Máxima
C _t	Última concentração mensurada
EEBrz	Extrato Etanólico Bruto raízes
EEtOH	Extrato Etanólico
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de Massas
EM-EM	Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas
EPP	Extração por precipitação de proteína

ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Eletrospray)
FATT - rz	Fração de Alcaloides Terciários Totais - raiz
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
IES	Ionização por Eletrospray
IL-10	Interleucina 10
Ion Trap-TOF	"Armadilha de íons" <i>Time of Flight</i>
Kel	Constante de eliminação
LMCA/UFPB	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise/Universidade Federal da Paraíba
LQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa/carga
MALDI	<i>Matrix Assisted Ionization</i> (Ionização a Laser Assistida por Matriz)
MEFS	Microextração em Fase Sólida
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MORF.	Morfinâmico
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de Reações Múltiplas)
m-WAR	Metil-warifteína
ng/mL	Nanograma por mililitro
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos
PAP	Papaverina
PgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
PI	Padrão interno
ppm	Partes por milhão
Q1	Quadrupolo 1
Q2	Quadrupolo 2
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (Monitoramento de Íon Seleccionado)
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de Reação Seleccionada)
$T_{\text{máx}}$	Tempo máximo
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tr	Tempo de retenção
UV-vis	Ultravioleta visível
WAR	Warifteína
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3.1 Aspectos botânicos, químicos, e farmacológicos de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	27
3.1.1 Aspectos botânicos	27
3.1.2 Características químicas	27
3.1.3 Características farmacológicas	34
4 Cromatografia	36
4.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	36
4.2 Desenvolvimento de método por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência	38
5 Espectrometria de massas	40
6 Preparo e extração de amostras em fluidos biológicos	44
6.1 Análise de substâncias em fluidos biológicos	45
6.2 Técnicas de extração de amostras	46
6.2.1 Extração líquido-líquido	46
6.2.2 Extração por precipitação de proteínas	48
6.2.3 Extração em fase sólida	49
CAPÍTULO I	
7 INTRODUÇÃO	56
8 MATERIAL E MÉTODOS	56
8.1 Substâncias de reagentes	56
8.2 Material vegetal	57
8.2.1 Obtenção da warifteína e metil-warifteína das raízes de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	57
8.2.2 Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes da planta	57
8.2.3 Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	58
8.2.4 Isolamento de warifteína, metil-warifteína e outros constituintes de <i>C. sympodialis</i> Eichl. em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-PREP)	58
8.5 Caracterização espectroscópica	59
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
9.1 Isolamento dos alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	60
9.1.1 Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. para a produção de fração de alcaloides terciários totais	60
9.1.2 Isolamento de warifteína, metil-warifteína e outros constituintes de <i>C. sympodialis</i> Eichl. em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa com detector de arranjo de diodo (CLAE-PREP-UV/DAD)	64
9.2 Dados espectroscópicos	75
9.2.1 Warifteína	75
9.2.2 Metil-warifteína	76
9.2.3 Des-7'-O-metilroraimina e seu epímero Epi-des-7'-O-metilroraimina	77
9.2.4 Espectrometria de massas	79

9.3 Elucidação estrutural de CS5	85
CAPÍTULO II	
10 INTRODUÇÃO	104
11 TÉCNICAS HIFENADAS	105
12 EFEITO MATRIZ	106
13 MATERIAL E MÉTODOS	108
13.1 Reagentes e Material	108
13.2 Equipamentos	108
13.3 Métodos	109
13.3.1 Preparo de soluções estoque e soluções de trabalho	109
13.3.1.1 Preparo de soluções de trabalho para obtenção de parâmetros de ionização no espectrômetro de massas por infusão direta	109
13.4 Condições cromatográficas para injeção de amostras em solução no sistema CLAE-EM/EM	110
13.5 Procedimento de obtenção de sangue e plasma de ratos	110
13.5.1 Preparo de amostras de sangue fortificado de rato	112
13.5.2 Procedimento de extração por precipitação de proteína de amostras de sangue de rato fortificado	112
13.5.3 Procedimento de extração por precipitação de proteínas de amostras de plasma de ratos fortificado	112
13.5.4 Procedimento de extração líquido-líquido de amostras de plasma de ratos para verificação de efeito matriz	113
13.5.5 Estimativa de limite de detecção de warifteína em plasma de ratos	113
13.5.6 Procedimento de administração do alcaloide warifteína e posterior coleta de sangue in vivo em ratos	114
13.6 Avaliação de efeito matriz	117
13.7 Parâmetros farmacocinéticos avaliados	117
14 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
14.1. Obtenção dos parâmetros de ionização para a warifteína através de infusão direta no espectrômetro de massas	118
14.2 Obtenção dos parâmetros cromatográficos para injeção em sistema CLAE-EM com amostras em solução	125
14.3 Obtenção dos parâmetros cromatográficos para injeção em sistema CLAE-EM com amostras de sangue fortificado	128
15 Ajuste de padrão interno	132
16 Avaliação da linearidade do método	137
17 Efeito matriz	141
18 Administração de warifteína em ratos e aplicação do método de extração para avaliação da farmacocinética	155
19 CONSIDERAÇÕES FINAIS	158
REFERÊNCIAS	159

1 INTRODUÇÃO

Cissampelos sympodialis Eichl. é uma espécie da flora brasileira, encontrada desde o Ceará até o norte de Minas Gerais, ocorrendo principalmente em áreas de semi-árido. Na cultura popular é denominada como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira”; suas folhas e raízes são empregadas na medicina popular para tratamento de doenças do trato respiratório, reumatismos e artrites (PORTO, 2008). Há algum tempo, a *Cissampelos sympodialis* Eichl. vem sendo estudada do ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico por pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

A infusão das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. é popularmente utilizada no nordeste do Brasil para tratamento de asma, bronquite e reumatismo, dentre outras enfermidades inflamatórias (ALEXANDRE-MOREIRA, 2003).

A análise fitoquímica de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. identificou várias classes de alcaloides como benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolícos, aporfínicos e morfinâmicos. Algumas substâncias isoladas da planta são: milonina, metilwarifteína, roraimina, warifteína e desmetil-roraimina (BARBOSA-FILHO, 1997; DE LIRA, 2002; MARINHO, 2013).

Apesar do isolamento destas substâncias a partir da fração de alcaloides terciários da raiz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. por técnicas convencionais, não há um método simples e reprodutível para o isolamento dos marcadores da espécie.

A cromatografia é uma técnica extensamente utilizada para fins de separação, detecção e quantificação de produtos. Além do que, pode ser uma ferramenta combinada a diferentes sistemas de detecção, sendo uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de excelente desempenho.

Dentro da análise cromatográfica, um importante método que vem alcançando impacto significativo em diversas áreas industriais, como a farmacêutica, a indústria de alimentos, de fragrâncias, de agroquímicos, etc., é a cromatografia preparativa (RAJENDRAN, PAREDES, MAZZOTTI, 2009).

O uso da cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa (CLAE-PREP) no isolamento de produtos naturais, mostra-se como uma técnica robusta, versátil e rápida, que garante a purificação e o isolamento de substâncias de matrizes complexas, como os

produtos naturais (STICHER, 2008). Isto faz dessa técnica uma ferramenta valiosa numa área em que a purificação e obtenção de amostras em quantidade é algo laborioso, e muitas vezes, faz-se necessário o reisolamento de amostras; assim, a reprodutibilidade da técnica é uma grande vantagem. A CLAE-PREP permite a utilização de colunas com dimensões superiores, bem como a aplicação de maior quantidade de amostra e fluxos de solventes mais elevados, garantindo a purificação e o isolamento de maiores quantidades de substância (LATIF, 2012).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica através da qual se ioniza uma amostra tornando possível medir a relação massa-carga dos íons resultantes. Assim, a técnica tem versatilidade que permite fazê-la uma ferramenta vital para uma vasta gama de aplicações, incluindo a pesquisa biológica. Ela tem capacidade de fornecer informações sobre a composição elementar de amostras; sua estrutura molecular, e a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; sendo assim, uma ferramenta analítica de grande importância (FINEHOUT, 2004).

As técnicas para a análise de ativos de drogas vegetais e seus derivados sofreram diversas evoluções do longo dos anos. A padronização físico-química de fitoterápicos podia ser feita utilizando-se a cromatografia em camada delgada, porém, técnicas mais sensíveis foram aprimoradas, como a cromatografia a líquido e a cromatografia gasosa acopladas ao espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear. Ainda, o acoplamento das técnicas cromatografia em camada delgada e densitometria empregando placas de alta eficiência tem sido utilizada em análise de ativos de drogas vegetais e seus extrativos, tanto quali quanto quantitativamente (KLEIN, LONGHINI, BRUSCHI, 2009)

O uso de técnicas hifenadas, ou seja, o acoplamento de técnicas analíticas; consiste na junção de duas ou mais técnicas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica com maior eficiência e rapidez que outras técnicas convencionais. A combinação da cromatografia a líquido com a espectrometria de massas (CLAE-EM) permite unir as vantagens da cromatografia, como a alta seletividade e eficiência de separação, às vantagens da espectrometria de massas, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade (VÉKEY, 2001). As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à espectrometria de massas são a cromatografia gasosa e a cromatografia a líquido de alta eficiência (CHIARADIA, 2008).

O acoplamento de técnicas analíticas permite melhorar os processos de obtenção de marcadores, garantindo maior grau de pureza, e também gerando uma alternativa ao uso

de processos convencionais. Assim, consegue-se obter produtos de maior qualidade dispondo-se de tecnologias com menor impacto ao meio ambiente

A cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é o método preferencial para a análise quantitativa de moléculas de baixo peso molecular; peptídeos e proteínas presentes em matrizes complexas tais como plasma, sangue, urina, fezes e tecidos, por exemplo. A razão para tal deve-se ao fato do espectrômetro de massas ser mais sensível e significativamente mais específico em relação a outros detectores, como o ultravioleta visível (UV-Vis), o fluorescência, e o índice de refração, detectando amostras da ordem de nano a picogramas por mililitro, permitindo a identificação de componentes em picos cromatográficos mesmo quando estes não possuem resolução de linha de base (picos completamente separados), reduzindo, assim, a necessidade de condições cromatográficas ideais (PARTICLE SCIENCES, 2009).

Um importante alcaloide isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl., a warifteína, reproduziu a atividade espasmolítica do extrato da planta em preparações de traqueia de cobaia (DE FREITAS, 1996). Pertinente a esse potencial efeito antiasmático da planta, estudos imunológicos demonstraram que o extrato da mesma pode aumentar a produção de interleucina-10 (IL-10) inibindo a resposta proliferativa de células T em células de baço de ratos estimuladas por concanavalina-A (PIUVEZAM, 1999).

Ainda, a avaliação toxicológica do extrato também vem sendo estudada através de estudos de citotoxicidade, hepatotoxicidade, avaliação da toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica além da toxicidade pós-natal (ALMEIDA, 1998; MELO, 2003).

A análise termogravimétrica (TG) de marcadores isolados, tal como o alcaloide bisbenzilisquinolona, warifteína, pode ser aplicada na padronização dos extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (ARAGÃO, 2002). Além disso, Marinho e cols. (2011) padronizou um método de quantificação para a detecção simultânea de warifteína, metil-warifteína e milonina em extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis* Eichl. utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodo num estudo do acúmulo dos alcaloides warifteína, metil-warifteína e milonina durante o ciclo vegetativo da planta.

Resultados promissores têm sido demonstrados através de avaliações pré-clínicas da administração do extrato de *Cissampelos sympodialis* Eichl. sobre a atividade antialérgica e imunomoduladora (BEZERRA-SANTOS, 2006).

Estudos também comprovaram propriedades anti-edema, anti-IgE e anti-hiperalgésicas da warifteína. Tais achados sugeriram que a warifteína pode representar uma nova estratégia para implementar o arsenal terapêutico disponível para controlar reações alérgicas imediatas (COSTA, 2008).

A resposta biológica de um fármaco ou de um extrato vegetal é determinada a partir da interação deste com receptores específicos ou processos enzimáticos. A magnitude desta resposta está intimamente relacionada com a quantidade de fármaco que chega ao seu local de ação, isto é, depende da concentração do fármaco disponível para a sua ação terapêutica. Tal concentração depende de diversos fatores, tais como (ANSEL, 2000):

- ✓ Propriedades físico-químicas dos fármacos;
- ✓ Liberação do fármaco da forma farmacêutica;
- ✓ Dose administrada;
- ✓ Quantidade absorvida;
- ✓ Distribuição no local de ação;
- ✓ Velocidade e quantidade eliminada pelo organismo.

Uma vez que os estudos relacionados à *Cissampelos sympodialis* Eichl. são muitos, e contemplam as diversas ações da planta referente ao seu uso popular, havendo mecanismos de ação sugeridos para a atividade antinflamatória e imuno-moduladora, dentre outros, torna-se importante avaliar se o alcaloide ao qual estas ações tem sido atribuídas, a warifteína, possui biodisponibilidade adequada. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um método que permita a quantificação do alcaloide em fluidos biológicos. A determinação da biodisponibilidade absoluta da warifteína permitirá abrir caminho para a determinação de sua biodisponibilidade relativa, através de outras vias de administração, como a oral por exemplo.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método rápido e reprodutível para o isolamento dos marcadores químicos estabelecidos e de outros alcaloides de *C. sympodialis* Eichl., e utilizar o padrão de warifteína para quantificação da mesma em fluidos biológicos com vistas à determinação de parâmetros farmacocinéticos do alcaloide após administração *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolvimento de metodologia rápida e eficiente para isolamento e caracterização de warifteína com grau de pureza adequado para estudos cinéticos preliminares;
- ✓ Obtenção, através de cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa, outros alcaloides para contribuir com a ampliação do conhecimento químico de *C. sympodialis* Eichl.;
- ✓ Desenvolvimento de metodologia para quantificação de warifteína em plasma de ratos através de CLAE-EM/EM;
- ✓ Aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos da warifteína após administração intravenosa em ratos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos botânicos, químicos, e farmacológicos de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

3.1.1 Aspectos botânicos

Cissampelos L. é um gênero pertencente à família Menispermaceae, tribo Cocculeae, sub-tribo Cissampelinae, composto por 19 espécies das quais 9 têm ocorrência no Brasil (RHODES, 1975). Destas, podemos encontrar no estado da Paraíba as espécies *Cissampelos sympodialis* Eichl., *Cissampelos glaberrima* St Hil. e *Cissampelos ovalifolia* DC. (Figura 1) todas com características morfoanatômicas semelhantes, mas diferenciadas ao exame cuidadoso das folhas e de seu *habitat* (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997).

Cissampelos sympodialis Eichl. é uma planta endêmica do Brasil, presente nas regiões nordeste e sudeste, desde o estado do Ceará até o estado de Minas Gerais, comum de áreas abertas e solo argiloso, distinguida principalmente pelo formato de suas folhas deltoides. É um subarbusto, ascendente, de ramos volúveis e levemente pubérulos acinzentados. (EICHLER 1887; RHODES 1975; BARBOSA-FILHO 1997).

Em relação às características anatômicas de diferenciação das espécies *Cissampelos*, destaca-se a morfologia das células da epiderme das folhas, onde *Cissampelos sympodialis* Eichl. possui células epidérmicas com paredes anticlinais na face adaxial, e onduladas a irregularmente ondulado-sinuosas na face abaxial; além disso, a ausência de reservatórios secretórios são características diagnósticas da espécie (PORTO 2008; PORTO 2010).

A germinação das sementes ocorre entre 18 a 25 dias, e o início da floração ocorre cerca de 150 dias pós-plantio, sendo o período compreendido entre a floração e o amadurecimento dos frutos de aproximadamente 26 dias (FONSECA, 1999).

3.1.2 Características químicas

A família Menispermaceae tem em sua constituição vários tipos de alcaloides, destacando-se aqueles pertencentes ao grupo dos bisbenzilisoquinolínicos (BBI), que por

sua vez derivam-se do esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico (BARBOSA-FILHO, 2002). O perfil de alcaloides dessa família é constituído por vinte e três grupos, perfazendo um total de 1522 alcaloides isolados no período de 1970 a 1997, sendo os mais abundantes os BBI (604 do total), seguidos pelos aporfínicos (303) e protoberberínicos (275) (ARAGÃO, 2002). O gênero tem seus alcaloides representantes derivados do núcleo isoquinolínico (IQ), com as 53 bases descritas na literatura pertencentes a 7 tipos de esqueletos diferentes (BARBOSA-FILHO, 1997).

Dentro das 19 espécies que representam o gênero *Cissampelos*, 9 têm ocorrência no Brasil (RHODES 1975; JACQUES, 2008) e na Paraíba, são encontradas as espécies *Cissampelos sympodialis* Eichl., *Cissampelos glaberrima* A.St.-Hil. e *Cissampelos ovalifolia* DC (BARBOSA-FILHO, 1997) (Figura 1).

Figura 1 – Fotos das espécies *Cissampelos glaberrima* A.St.-Hil., *Cissampelos ovalifolia* DC., e *Cissampelos sympodialis* Eichl.



Cissampelos glaberrima
Fonte: KEW.ORG



Cissampelos ovalifolia
Fonte: PORTO, 2013

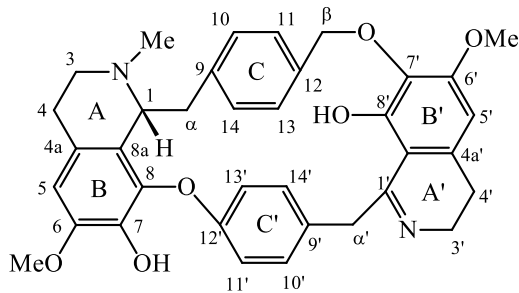
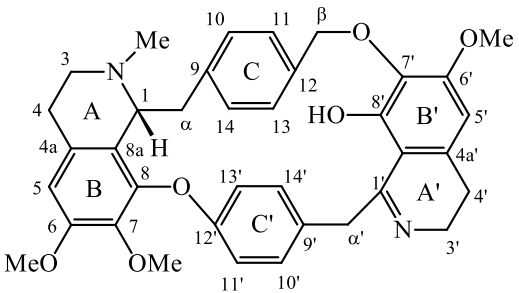
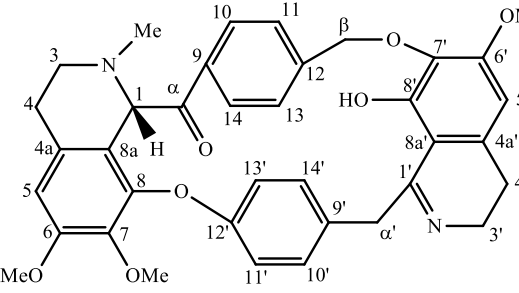
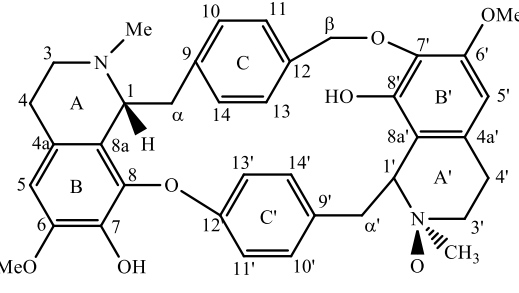
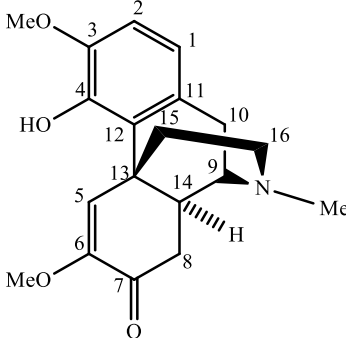


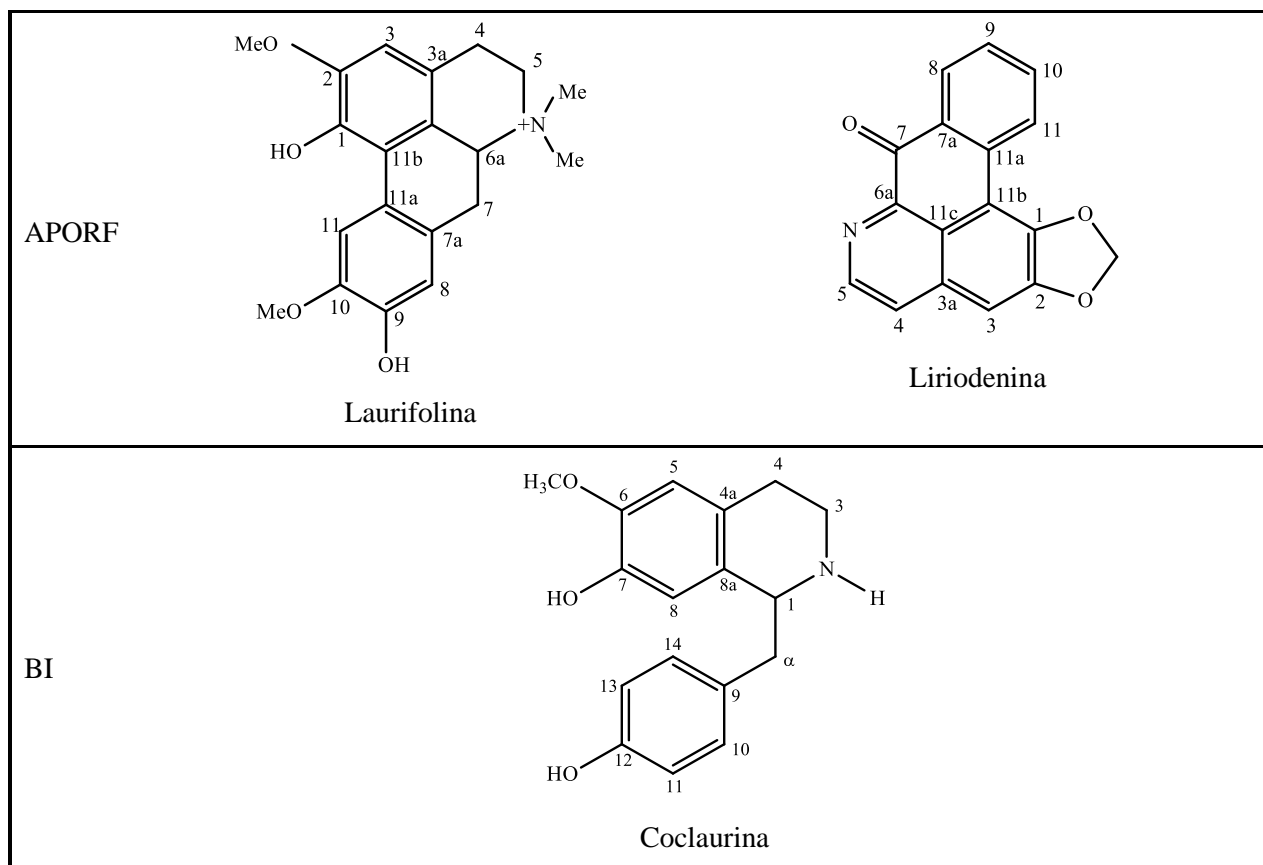
Cissampelos sympodialis
Fonte: MELO, 2012

Estudos com *Cissampelos sympodialis* Eichl. na Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) datam de longo tempo; e desde o início desses estudos, vários foram os alcaloides isolados (Quadro 1). Dentre estes alcaloides, podemos encontrar nas folhas e também nas raízes, os bisbenzilisoquinolínicos, warifteína (WAR) e metil-warifteína (m-WAR) (CORTES 1995; DE FREITAS 1996; BARBOSA-FILHO 1997) (ALENCAR, 1994); nas folhas, temos o morfinâmico (MORF) milonina (DE FREITAS 1996), e o benzilisoquinolínico (BI) coclaurina (DE LIRA 2002); e nas raízes, os bisbenzilisoquinolínicos simpodialina β -N-óxido (ALENCAR, 1994), roraimina (DE

LIRA 2002), e os epímeros des-7'-O-metilroraimina e epi-des-7'-O-metilroraimina (MARINHO, 2013), além dos aporfinicos (APORF) laurifolina (ALENCAR, 1994) e liriodenina (DE LIRA 2002). Destes, o alcaloide predominante é a warifteína, que foi isolada com rendimento de cerca de 1,4 % (p/p em relação às raízes secas) quando isolado em raízes da planta (BARBOSA-FILHO 1997) (Quadro 2).

Quadro 1 – Alguns alcaloides isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Classe	Alcaloide representante
BBI	 <p>Warifteína</p>
	 <p>Metil-Warifteína</p>
	 <p>Roraimina</p>
	 <p>Simpodialina-β-N-óxido</p>
MORF	 <p>Milonina</p>



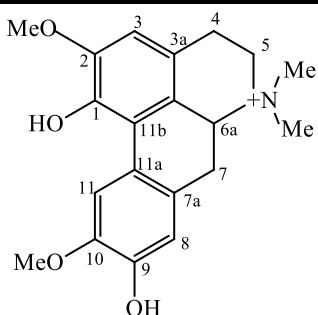
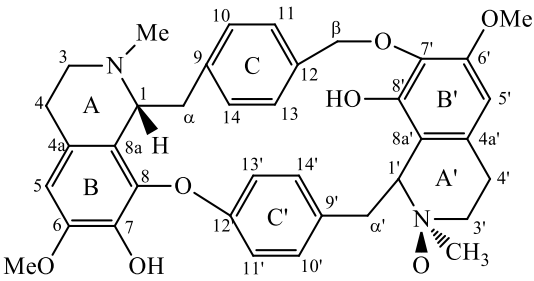
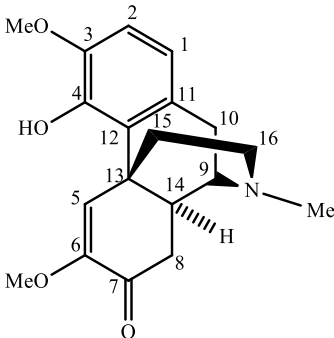
A warifteína, principal alcaloide presente no extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. apresenta-se como um pó amorfo amarelado, seu ponto de decomposição ocorre em 256 °C (ARAGÃO, 2001). É insolúvel em solventes polares, mas seu sal é solúvel em água em pH ácido (CERQUEIRA-LIMA, 2010), isso é possível numa concentração aproximada de 1 % do peso do extrato etanólico concentrado das folhas (THOMAS, 1997).

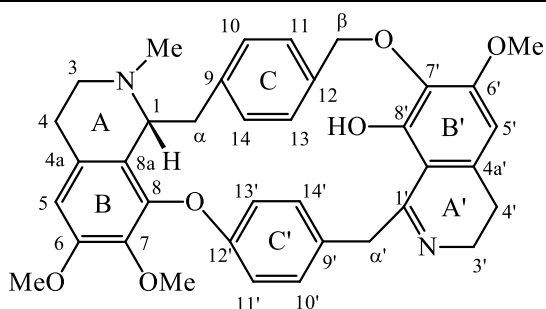
A primeira referência de isolamento de warifteína foi na espécie de *Cissampelos ovalifolia* DC. (GORINSKY, 1972; MUKHERJEE, 2003). O interesse pelo estudo dessa espécie motivou-se uma vez que a mesma era utilizada pelos índios sul-americanos na preparação do curare (GORINSKY, 1972).

Marinho e colaboradores (2011) realizaram um estudo visando a padronização do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. no qual foi possível o desenvolvimento de um método de cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação simultânea de três alcaloides que são marcadores bioativos do extrato da planta; um deles presente exclusivamente nas folhas (milonina), e outros dois nas folhas e também nas raízes (WAR e m-WAR). O método desenvolvido avaliou a concentração de

warifteína, metil-warifteína e milonina durante o ciclo vegetativo da planta no qual se observou que a concentração dos mesmos era mínima no período dos frutos maduros. Visto que tanto warifteína quanto metil-warifteína são encontrados no extrato desses frutos, sugeriu-se que a biosíntese dos alcaloides é direcionada das folhas para os frutos durante o amadurecimento.

Quadro 2 – Alcaloides isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e suas atividades farmacológicas (CAVALCANTI *et al.*, 2013)

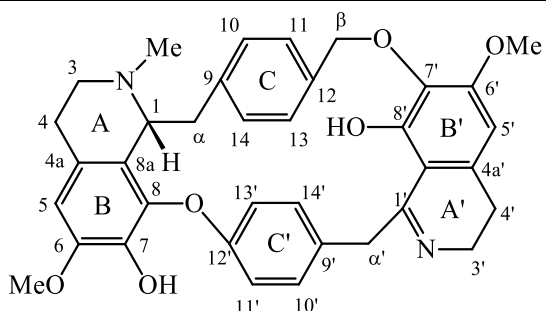
Alcaloide/Estrutura química	Atividade farmacológica	Parte da planta
 <p>Laurifolina (ALENCAR, 1994)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pode atuar como agente antiretroviral promissor uma vez que inibiu consideravelmente o vírus da transcriptase reversa de mieloblastose em aves (JUCÁ, 1998). 	<ul style="list-style-type: none"> • Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. • Também isolada de <i>Hypserpa nitida</i>, Menispermaceae (CHENG, 2007)
 <p>Simpodialina-β-N-óxido (ALENCAR, 1994)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não relatada 	<ul style="list-style-type: none"> • Presente nas raízes de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.
 <p>Milonina (DE FREITAS <i>et al.</i>, 1995)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito hipotensor e vasorelaxante em ratos normotensos (CAVALCANTE, 2011); • Efeito espasmolítico (DE FREITAS 1996; MELO, 2003); • Efeito citotóxico em cultura de hepatócitos e fibroblastos V79 (MELO, 2003); • Pode contribuir para os efeitos antialérgicos do extrato de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (BEZERRA-SANTOS, 2012). 	<ul style="list-style-type: none"> • Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. • Também isolada de <i>Dehaasia longipedicellaata</i> (MUKHTAR <i>et al.</i>, 2004)



Metil-warifteína (BARBOSA FILHO *et al.*, 1997)

- Mostrou atividade inibitória significativa e reprodutível contra células de carcinoma em cultura de células da nasofaringe (KUPCHAN, 1965; CORTES, 1995).

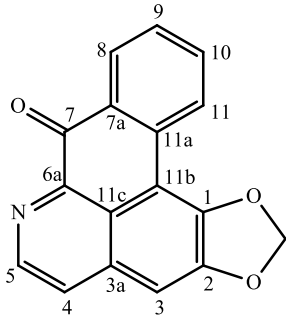
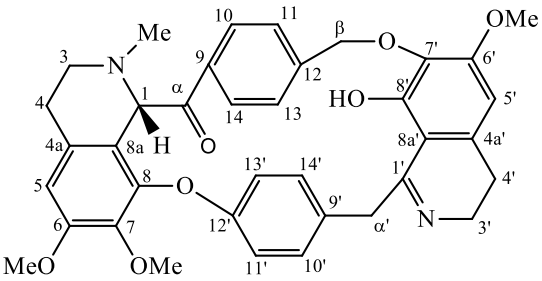
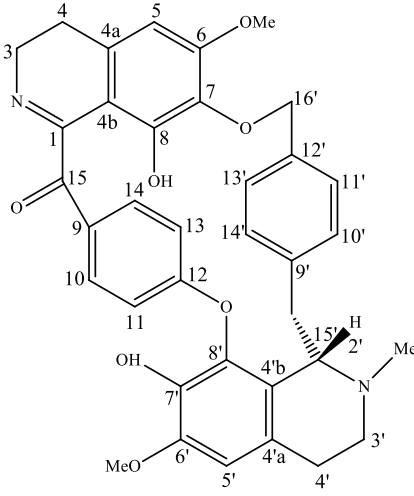
- Presente nas folhas e raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl.
- Também isolada em *Cissampelos ovalifolia* DC, (BORKAKOTI, 1978); *Aristolochia ridicula*, *Aristolochiaceae* (MACHADO, 2010)



Warifteína (BARBOSA FILHO *et al.*, 1997)

- Mostrou atividade espasmolítica, efeito relaxante tanto tecido de músculo liso vascular quanto no não vascular (CORTES *et al.*, 1995, DE FREITAS *et al.*, 1996, MELO *et al.*, 2003);
- Apresentou citotoxicidade em linhagem de fibroblastos (V79); inibição da degranulação de mastócitos e da liberação de histamina (MELO *et al.*, 2003);
- Ação anti-alérgica (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006);
- Inibe seletivamente a atividade de AMPc fosfodiesterase (THOMAS *et al.*, 1997)
- Induz o relaxamento muscular pela inibição de canais de cálcio e modificação dos estoques intracelulares de cálcio sensíveis a noradrenalina (CORTES *et al.*, 1995, DE FREITAS, 1994).

- Presente nas folhas e raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl.
- Também isolada em *Cissampelos ovalifolia* DC, (BORKAKOTI, PALMER, 1978)

 <p>Liriodenina (DE LIRA <i>et al.</i>, 2002)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Várias atividades farmacológicas, como antitumoral, antibacteriana, antifúngica e trypanocida, bem como anti-Alzheimer (LIU, 2010) • Atividade larvicida contra larva de <i>Aedes aegypti</i> (FEITOSA, 2009) • Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. • Também isolada de <i>Annona crassiflora</i>, Annonaceae (GONÇALVES, 2009), (<i>Annona foetida</i>, Annonaceae, (COSTA, 2011), <i>Zanthoxylum nitidum</i>, Rutaceae (CHEN <i>et al.</i>, 2012), <i>Rollinia leptopetala</i>, Annonaceae (FEITOSA, 2009)
 <p>Roraimina (DE LIRA <i>et al.</i>, 2002)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pode contribuir para os efeitos anti-alérgicos do extrato de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (BEZERRA-SANTOS <i>et al.</i>, 2012) • Presente nas raízes de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.
 <p>Des-7'-O-metilororaimina (MARINHO, 2011)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não relatada • Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (MARINHO, 2011)

3.1.3 Características farmacológicas

As plantas medicinais são uma alternativa aos tratamentos convencionais para diversas enfermidades, e muitas vezes o conhecimento sobre sua forma de uso é o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002).

Tribos indígenas e a própria medicina popular utilizam largamente as plantas do gênero *Cissampelos* para cuidar de várias doenças, do tipo: cardíacas, genito-urinárias, diarreias, resfriados e asma (VIEIRA, 2008). A *Cissampelos sympodialis* Eichl. tem seu uso mais comum no nordeste brasileiro na forma de infusão de suas raízes para tratar asma, bronquite, resfriado e reumatismo, e também outras doenças inflamatórias (CORREA, 1984).

O alcaloide warifteína foi descrito com atividade bloqueadora neuromuscular não-despolarizante com potência similar à da tubocurarina, além de sua atividade anestésica local (GORINSKY *et al.*, 1972). Juntamente com a warifteína, outros alcaloides bioativos isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl., metil-warifteína e milonina, também estão relacionados com a atividade farmacológica descrita para o extrato da planta.

O uso do extrato hidroalcoólico das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. apresentou efeito relaxante na musculatura lisa da traquéia de cobaia e aumentou os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) em macrófagos alveolares de cobaias, provavelmente associado à inibição de enzimas fosfodiesterases, ação essa comparável àquela da aminofilina, um clássico broncodilatador (THOMAS *et al.*, 1995). O estudo pré-clínico das folhas da planta também mostrou a presença da atividade broncodilatadora *in vivo* e *in vitro* (THOMAS *et al.*, 1997), a elevação dos níveis de AMPc e inibição de fosfodiesterases em músculo liso de traqueia de cobaia (THOMAS, BURNS, PYNE, 1997).

Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico das cascas das raízes de *Cissampelos sympodialis* por via oral, pré-clínicos, agudo e crônico, não demonstraram efeitos tóxicos em camundongos e ratos em dose até 20 vezes maior que a dose utilizada pela população (chá com 3 g de pó das folhas/dia) na terapêutica de problemas respiratórios (DINIZ *et al.*, 1995).

Demonstrou-se a ação imunomoduladora e antiinflamatória das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. por elevação dos níveis de interleucina 10 (IL-10) *in vitro*, a qual inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e monócitos

(PIUVEZAM *et al.*, 1999). Ainda, através do modelo experimental de macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi*, foi sugerido que o efeito antiinflamatório do extrato da planta poderia ser mediado pela inibição da função dos macrófagos decorrente do aumento de produção de IL-10, levando a inibição da atividade de anti-*Trypanosoma cruzi* destas células (ALEXANDRE-MOREIRA *et al.*, 2003)

A fração aquosa do extrato etanólico das folhas foi investigada quanto aos efeitos cardiovasculares, demonstrando que quando administrada por via endovenosa tem a capacidade de aumentar a pressão arterial de ratos acordados e anestesiados e, em preparações de átrio isolado, induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos (MEDEIROS *et al.*, 1998). Atribuiu-se a capacidade de aumentar a pressão arterial de ratos a um aumento da resistência vascular periférica. Esta fração induziu contração em preparação isolada de aorta de rato através da ativação de α -adrenoceptores (FREITAS *et al.*, 2000; XAVIER *et al.*, 1998).

A atividade de *Cissampelos sympodialis* Eichl. também foi avaliada sobre o sistema nervoso central em camundongos e ratos. Ensaios preliminares com o extrato etanólico das folhas da planta sugeriram uma atividade estimulante, provavelmente do tipo antidepressiva, possivelmente devido à atividade inibitória da enzima fosfodiesterase pelo extrato (ALMEIDA *et al.*, 1998).

O tratamento crônico com o extrato da planta levou à diminuição da ingestão de alimentos e do peso corporal de ratos machos e fêmeas, além de mudanças comportamentais em ratos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O estudo do alcaloide warifteína isolado, mostrou que o mesmo causa relaxamento da musculatura da aorta de coelhos por inibição de canais de cálcio e modificação dos depósitos de cálcio intracelulares sensíveis à noradrenalina (DE FREITAS *et al.*, 1996). Este mesmo alcaloide também causa inibição do influxo de eosinófilos e da produção de leucotrienos cisteínicos da cavidade pleural e do pulmão de camundongos sensibilizados (BEZERRA SANTOS *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008).

Ainda referente ao estudo do alcaloide isolado, demonstrou-se a capacidade do mesmo proteger da morte por choque anafilático dependente de imunoglobulina E, camundongos sensibilizados com ovalbumina que foram tratados com a warifteína previamente, num intervalo de trinta minutos após a provocação, quando comparados com o grupo de animais não tratados e sensibilizados com ovalbumina, não havendo, porém,

resposta de proteção após sessenta minutos de provocação (COSTA *et al.*, 2008; BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006).

A ausência de toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. foi demonstrada em ensaios toxicológicos pré-clínicos realizados com ratos machos e fêmeas. Para o estudo, utilizou-se a dose e a via de administração de uso popular, que é de 9,0 mg/Kg por via oral, para ensaios de toxicidade subaguda e crônica (4 e 13 semanas, respectivamente). Ainda avaliou-se a toxicidade para cães, que também foi semelhante à demonstrada para ratos, mesmo sendo a dose testada cinco vezes maior que a que é utilizada popularmente (DINIZ, 2000).

4 Cromatografia

A cromatografia constitui uma técnica de separação físico-química de misturas complexas largamente utilizada nas análises farmacêuticas de rotina ou academicamente. Sua introdução no meio científico deu-se ainda no século XX (em 1906) pelo botânico ítalo-russo M. S. Twest que empregou uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio e usou éter de petróleo para separar clorofilas e xantofilas de plantas passando uma solução através desse sistema; seu uso, porém, tardou em ficar habitual (ARDREY, 2003; SCOTT, 2003).

No que se refere aos aspectos cromatográficos em bioanálise, o principal objetivo da análise nesta técnica é a separação de compostos endógenos, pois os mesmos podem gerar um efeito matriz quando utilizada a espectrometria de massas como detecção do método (DAMEN, 2009).

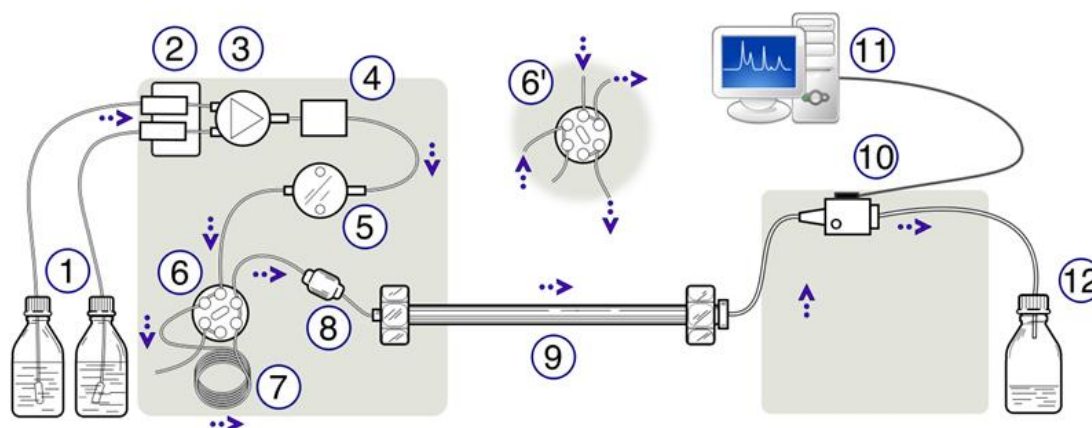
4.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Dentre as técnicas cromatográficas, a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência teve um avanço considerável ao longo dos últimos anos. Isto se deve à sua capacidade de uso de pequenas colunas com recheios especialmente preparados para eluição com fases móveis a altas pressões. A técnica destaca-se, ainda, pelo desempenho em separações e análises qualitativas e quantitativas para uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras (ambientais, farmacêuticas, biológicas e alimentos) num

tempo de poucos minutos, com elevada resolução, eficiência e sensibilidade (RIBANI, 2004; TONHI, 2002).

Diferentemente da cromatografia a líquido clássica, onde o recheio da coluna somente é utilizado uma única vez, na CLAE, utiliza-se uma coluna empacotada fechada, de uso para centenas de separações individuais na mesma coluna, que pela ação de altas pressões, permite a passagem da fase móvel líquida através da mesma. Assim, o sistema de CLAE tem em sua composição básica: reservatório para solventes, sistema de bombeamento de fase móvel, válvula de injeção da amostra, coluna de separação cromatográfica, sistema para detecção da amostra, sistema de registro e tratamento de dados, como visualizado na figura 2.

Figura 2 – Esquema básico de um sistema de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. (FONTE: Adaptado de: http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UC_Davis/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_2%3A_High_Performance_Liquid_Chromatography).



Legenda: 1: reservatório de solventes; 2: degaseificador; 3: formador de gradiente; 4: misturador de solventes; 5: bomba; 6: válvula para injeção de amostras; 7: *loop* de injeção; 8: pré-coluna; 9: coluna cromatográfica; 10: detector; 11: sistema de aquisição e processamento dos dados; 12: reservatório de descarte.

No cromatógrafo ocorre o bombeamento da fase móvel, que se encontra no reservatório (1), através de bombas de alta pressão (5) que carrega pelo sistema juntamente, a fase móvel e a amostra inserida no injetor (6), passando pela coluna cromatográfica (9) que separará os analitos na mistura chegando ao sistema de detecção (10) que fará a determinação de alguma propriedade específica da molécula (absortividade, potencial de oxidação, índice de refração, etc.) o sinal do detector será transformado num sinal elétrico

que logo em seguida é registrado e tratado pelo sistema de registro e tratamento de dados (11) que graficamente representará um cromatograma.

Na CLAE que utiliza colunas de fase reversa, o mecanismo de separação da amostra ocorre de acordo com o coeficiente de partição da mesma, uma vez que há a distribuição do soluto entre os dois líquidos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. Assim, no percurso do analito pelo sistema, através da fase móvel, ocorrerá a interação do analito ora com a fase móvel, ora com a fase estacionária, o que causará a retenção de cada analito. Após a retenção na fase estacionária, o detector dotado de alta sensibilidade registra a passagem do analito em função do tempo (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

4.2 Desenvolvimento de método por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Para desenvolver um método cromatográfico, faz-se necessário, antes de tudo, o conhecimento do próprio processo, além disso, é preciso conhecer alguns aspectos da amostra objeto da análise como: estrutura química, grupos funcionais, polaridade, solubilidade, concentração, pH.

A CLAE apresenta-se como um método para análise dos mais diversos materiais, podendo-se realizar separações de espécies iônicas, macromoléculas biológicas e ainda, produtos naturais lábeis, além de uma grande variedade de outros compostos de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica (KASAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Para que o método cromatográfico desenvolvido seja válido, temos que considerar parâmetros de desempenho analítico como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e quantificação.

A seletividade consiste na capacidade de avaliar inequivocamente a substância em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa. Nela, avalia-se o grau de interferência de outras substâncias, como um ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, por exemplo. É a seletividade que garante que o pico de resposta seja exclusivamente da substância de interesse, e uma vez não assegurada, haverá comprometimento, também, de outros parâmetros de qualidade como a linearidade, a exatidão e a precisão (RIBANI, 2004; VESSMAN, 2001).

A avaliação da seletividade pode ser feita comparando-se uma matriz isenta da substância de interesse com uma matriz em que a substância foi adicionada (nesse caso um

padrão), dessa forma, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve ter boa separação dos demais compostos presentes na amostra. Outra forma de avaliá-la é utilizando-se detectores do tipo arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetro de massas, que possibilitam comparar o espectro do pico obtido na separação com o pico de um padrão, sendo esta uma indicação da presença do composto puro (SHABIR, 2003).

A capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada faixa de aplicação corresponde à linearidade. A partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da substância de interesse, obtém-se a equação da reta e uma curva analítica, determinando-se a linearidade do método. A curva de calibração deve ser elaborada para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica (ARAGÃO, 2009; RIBANE, 2004).

Na construção da curva de calibração de um método, deve-se utilizar entre seis e oito concentrações conhecidas do analito, ou seja, do padrão de calibração, adicionado à mesma matriz para a qual o método foi desenvolvido e será aplicado. As concentrações utilizadas devem obedecer ao intervalo de variação esperado, desde o limite de quantificação (LQ) até 120 % da concentração máxima analisada; também se deve analisar a amostra branco, que é composta pela matriz isenta do analito e do padrão interno (BRASIL, 2012). Os critérios para aceitação da curva de calibração seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais.

Dentre as formas de padronização de um método pode-se seguir a padronização externa, a padronização interna e a padronização por adição de padrão. A determinação de qual forma de padronização será seguida dependerá de qual tratamento será dado à amostra, bem como do tipo de análise realizada, de forma que o método de padronização escolhido forneça os melhores resultados para exatidão e níveis de precisão (CUADROS-RODRÍGUEZ; GÁMIZ-GRACIA, ALMANSA-LÓPEZ, *et al.*, 2001)

Os principais critérios utilizados para avaliar a qualidade de um método bioanalítico são a precisão e a exatidão, que determinam os erros de uma medida analítica. Na precisão, medem-se os erros aleatórios, e estes representam a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea, sendo um importante parâmetro para garantir a confiabilidade do método analítico. Na exatidão, temos o grau de concordância entre os resultados

individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (CASSIANO, 2009).

5 Espectrometria de massas

A definição da técnica de espectrometria de massas (EM) consiste na ionização de uma amostra e medida da razão massa/carga resultante dos íons formados. A versatilidade da técnica tem permitido seu uso como uma ferramenta vital em uma vasta área, incluindo a pesquisa biológica. Isto se deve ao fato de que os espectrômetros podem fornecer informações sobre a composição elementar, isotópica e molecular de amostras orgânicas e inorgânicas. Além disso, as amostras podem ser analisadas em seu estado gasoso, líquido ou sólido; e a faixa de massas pode variar da ordem de um único átomo (vários Daltons) até proteínas (mais de 300.000 Daltons) (FINEHOUT, 2004).

O primeiro espectrômetro de massas surgiu em 1912, construído pelo físico britânico J. J. Thompson. O uso do equipamento àquela época era primariamente para o estudo do peso atômico de elementos e da abundância natural de isótopos elementares. Os instrumentos ainda não podiam ser utilizados para o estudo de biomoléculas, mas não demoraria muito até que pudessem analisar traços de isótopos pesados em sistemas biológicos. O aperfeiçoamento da abrangência de massas que poderiam ser analisadas e os tipos de amostras a vaporizar tornariam possível o estudo de compostos orgânicos (ASMS, 2013).

A aplicação da EM à biologia data da década de 1940 quando traços de isótopos estáveis foram utilizados no estudo de processos como a produção de dióxido de carbono em animais. A partir disso, avanços na tecnologia têm levado a uma maior diversidade dos tipos de amostras que podem ser ionizadas aumentando as aplicações da EM (LAETER, 2001).

Os componentes básicos do sistema do espectrômetro de massas são a fonte de ionização, o analisador de massas e o coletor iônico/sistema de detecção. A primeira, é responsável pela produção dos íons da amostra; já o analisador de massas, responde pela separação dos íons com diferentes razões m/z formados; e por fim, o detector identifica os diferentes íons formados. Deve haver também um computador acoplado para processar e gravar as informações, e uma bomba de vácuo para controlar a pressão no equipamento. A baixa pressão, a níveis inferiores ao atmosférico, na ordem de 10^{-6} a 10^{-8} Torr, é necessária

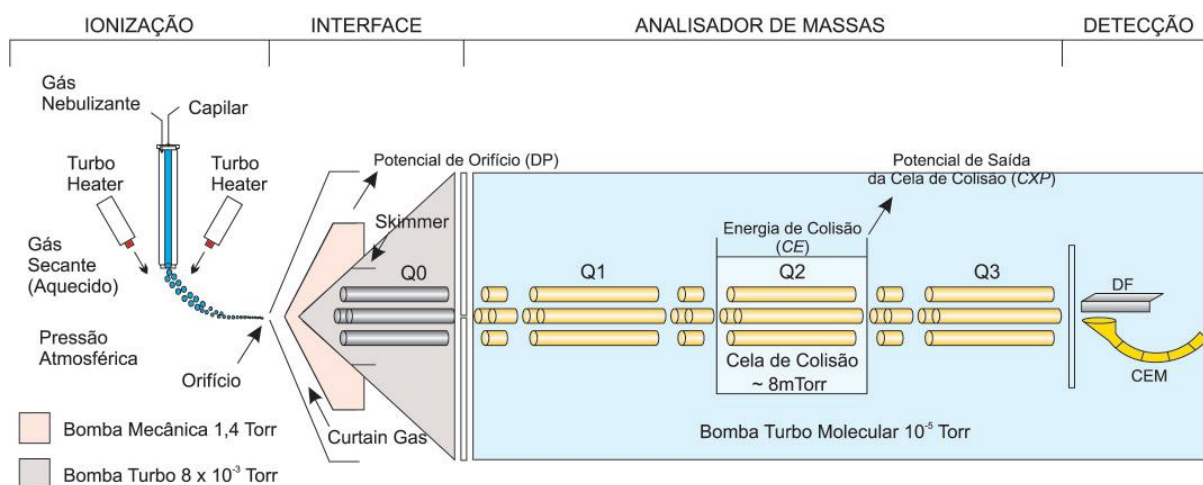
para limitar o número de colisões dos íons, que poderia alterar a rota dos mesmos e possivelmente gerar produtos de reação indesejáveis ou perda de carga (DE HOFFMANN; CHARETTE; STROOBANT, 1996).

É no analisador de massas que ocorre a separação dos íons e sua consequente captura. A separação dos fragmentos dotados de carga elétrica (ionizados) pode ser obtida submetendo-os à influência de um campo magnético; ou submetendo-os a uma combinação de campos criados por corrente contínua e frequência de rádio (quadrupolo); ou por efeito de ressonância ciclotrônica de íons; ou por último, medindo o tempo de migração de cada fragmento ao percorrer uma distância fixa (*Time of Flight* – TOF). Fragmentos neutros, uma vez que não são afetados pelo campo magnético ou outro sistema de separação ou filtração de massas, não são detectados, pois o detector não os percebe (SOARES, 2006).

As configurações de aparelhos de espectrometria de massas mais comuns são o espectrômetro de massas em estágio único, onde há somente um filtro (Quadrupolo, Armadilha de íons – *Ion trap*, TOF) sendo utilizado para a detecção de massas; e outro tipo de equipamento que possui um filtro de massas em três estágios, que é um espectrômetro de massas acoplado a outro espectrômetro de massas (*tandem*), que pode incluir quadrupolos, quadrupolos e *ion traps*, e quadrupolos e TOF.

Com exceção da configuração quadrupolo/*ion trap* a operação do sistema ocorre de forma que no primeiro quadrupolo (Q1) há um filtro de massa ajustado para uma razão m/z de um íon precursor específico; os precursores identificados pelo Q1 entram no segundo filtro de massas (Q2), responsável pela dissociação induzida por colisão dos íons precursores através da introdução do gás de colisão em Q2; e o terceiro filtro de massas é utilizado para monitorar o fragmento produto da dissociação em Q2 (esse modo é denominado Monitoramento de Reação Seleccionada – *Selected Reaction Monitoring* – SRM), ou vários fragmentos de múltiplas dissociações (Monitoramento de Reações Múltiplas – *Multiple Reaction Monitoring* – MRM), ou ainda, cada fragmento formado no processo (*Product Ion Scanning*). Na figura 3 podemos visualizar um esquema de acoplado EM/EM com ionização por eletrospray e seus respectivos quadrupolos (CROTTI, 2006; MARTINS JÚNIOR, 2006).

Figura 3 – Esquema representativo de um sistema de espectrometria de massas ESI/EM-EM com triplo quadrupolo e fonte de ionização eletrospray. (FONTE: MARTINS JÚNIOR, 2006).



A detecção de analitos ionizados por espectrometria de massas pode ser realizada no modo de varredura (*Linear scan*), o qual permite monitorar uma faixa de valores de m/z constantemente, ou no modo que permite uma monitorização seletiva de íons – Monitoramento de Íon Seleccionado (*Selected Ion Monitoring* – SIM), no qual um ou vários íons em particular com razão m/z específica é seleccionado para monitoramento. Quando se usa a espectrometria de massas acoplada (EM/EM) torna-se possível combinar os dois modos de detecção em diferentes estágios no mesmo equipamento (OLIVEIRA, 2000).

A finalidade da fonte de ionização é promover a ionização da amostra, e em alguns casos, nebulizá-la. Os tipos mais comumente utilizados em pesquisa biológica incluem a ionização por impacto de elétrons, ionização química, ionização térmica, ionização por eletrospray/nebulização de elétrons (IES), e ionização a laser assistida por matriz (MALDI). A escolha pela fonte de ionização dependerá das propriedades da amostra e do grau de ionização e fragmentação desejadas. Alguns experimentos requerem a amostra ionizada intacta, e outros, que a fragmentação molecular aconteça (FINEHOUT, 2004).

Na fonte de ionização por nebulização de elétrons a substância é ionizada quando o fluxo de entrada da amostra no equipamento (fase líquida) é introduzido pelo capilar que está sob a ação de uma voltagem. Nesse processo, há a formação de um nebulizado de gotículas altamente carregadas que são dessolvatadas ao longo de sua passagem por diversos estágios de diminuição de pressão. Em alguns casos, as gotículas também passam

através de um capilar aquecido para melhorar a dessolvatação. Uma das razões do largo emprego dessa técnica de ionização é sua compatibilidade com separações *on-line*, tais como a cromatografia a líquido; ainda, essa ionização geralmente resulta em múltiplos íons, o que aumenta a faixa de massas que podem ser analisadas (ARNOTT, 2001).

A técnica de eletrospray permite uma ionização suave, o que leva a uma fragmentação mínima da substância alvo e com isso, uma fácil obtenção do peso molecular do íon pai. Porém, em algumas situações necessita-se de fragmentações que gerem informações estruturais também. A fragmentação pode ser facilmente induzida pela ionização eletrospray através do aumento da voltagem entre os cones, o que aumenta a energia de colisão dos íons neutros e leva a uma decomposição induzida por colisão; tal fragmentação pode ser bastante seletiva (DYSON, 2000).

Quando se aumenta a diferença de potenciais entre o cone de amostragem de íons e o cone extrator o resultado é a aceleração dos íons extraídos, e consequentemente, o aumento da energia de colisão desses íons com as moléculas de gás residual na região de pressão intermediária da fonte de ionização. Esse processo pode ocasionar uma maior dissociação das moléculas cationizadas ou das moléculas protonadas, o que depende do tipo de substância. Essa dissociação é conhecida como dissociação induzida na fonte de ionização (ou dissociação na fonte), e pode ser utilizada para obtenção de informações estruturais de substâncias puras e/ou previamente separadas por CLAE/EM. Um dos maiores problemas desse tipo de dissociação é a transferência de carga do fragmento carregado para um fragmento neutro, que pode ser proveniente da molécula, ou ainda, um produto neutro qualquer da matriz (CROTTI, 2006).

É dentro do capilar que acontecem a protonação e a desprotonação de uma substância, e a extensão desses processos depende, por exemplo, da estrutura da substância e do solvente. Amostras que contêm grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, são analisadas em modo positivo, pois são protonadas de forma relativamente fácil. Já amostras que contêm funções ácidas, como os ácidos carboxílicos e os fenóis, sofrem desprotonação mais fácil, assim, são analisadas no modo negativo (VESTAL, 2001).

As técnicas de espectrometria de massas, CLAE-EM *off-line* para análise qualitativa, bem como a cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para detecção quantitativa, tem sido prática comum por vários anos. Porém, o acoplamento CLAE-EM com finalidades quantitativas era algo complicado até a

introdução de técnicas por Ionização à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization* – API) como Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI) e Ionização por Eletrospray/Nebulização (*Electrospray Ionization* – ESI) na década de 80. Estas interfaces evoluíram ao longo do tempo permitindo o uso da técnica de CLAE-EM amplamente como uma ferramenta de bancada, especialmente em análise farmacêuticas (STOKVIS, 2005).

A grande variedade de interfaces e configurações ópticas tornam a transferência de métodos validados uma tarefa difícil. Mas as interfaces de ionização a pressão atmosférica dominam os sistemas hifenados CLAE-EM (GRAY, 2010).

6 Preparo e extração de amostras em fluidos biológicos

A preparação da amostra é, talvez, a etapa mais importante no decorrer de qualquer análise. A menos que se esteja trabalhando com amostras puras ou padrões, a análise pode se tornar complicada devido à interferentes presentes na amostra. Um bom exemplo é uma matriz complexa (como o sangue ou o plasma), pois os metabólitos formados naturalmente geralmente são mais polares do que seus compostos originais, e isso ocorre de forma a facilitar os processos de eliminação e excreção. Esse processo, porém, na cromatografia, torna a separação bastante complicada (MCMASTER, 2010).

As técnicas de preparação de amostras buscam eliminar, em grande parte, qualquer material estranho presente nas mesmas, antes de sua injeção na coluna cromatográfica. Com isso, almeja-se a diminuição do tempo de corrida, além de um método isocrático ao invés de gradiente. Além disso, outro benefício seria o enriquecimento da amostra, o aumento da concentração da mesma, e consequentemente, de sua detectabilidade.

A primeira etapa na preparação da amostra para a injeção é a garantia de que a mesma está dissolvida por completo, e isenta de matéria particulada, que é removida pela filtração utilizando filtros de seringa. Mas se a matriz em análise é composta por sangue, faz-se necessária a eliminação de células sanguíneas, o que é obtido pela centrifugação. Deve-se atentar para uma possível perda de analito durante estes procedimentos, assim, deve-se checar essa perda pela adição de quantidades conhecidas de composto alvo numa quantidade representativa de sangue, removendo material interferente, e assim avaliando quantitativamente a recuperação de padrões adicionados.

6.1 Análise de substâncias em fluidos biológicos

O interesse pela análise de compostos presentes em fluidos biológicos permeia várias áreas, como a farmacêutica, a análise clínica, a medicina legal. Parte do desenvolvimento de estudos *in vivo*, refere-se à coleta e extração de amostras dos fluidos biológicos. Para tanto, fazem-se necessários métodos capazes de “limpar” tais fluidos dos interferentes presentes para promover uma análise mais eficiente, com seletividade pelo analito, eliminando os interferentes presentes (proteínas, por exemplo) e minimizando as perdas do analito.

Dentre as matrizes biológicas utilizadas na identificação e quantificação de diversas substâncias, consideram-se as clássicas, como a urina e o sangue, além de matrizes alternativas, como o cabelo, a saliva, o suor (MOELLER, 1998). Muitos componentes estão presentes nessas matrizes biológicas; macromoléculas como as proteínas, os carboidratos e os lipídios, além de uma variedade de pequenas moléculas com diferentes polaridades, o que dificulta a análise, podendo ocorrer, inclusive, precipitação e adsorção na coluna analítica, gerando alterações na pressão do sistema, no tempo de retenção e perda de capacidade e eficiência da mesma (ANOVÁ; HUTTA, 2003).

O preparo cuidadoso da amostra biológica é primordial para que a mesma seja adequada ao método escolhido, assim, de forma a minimizar a problemática de interferentes na amostra, etapas analíticas com finalidade de eliminação dos interferentes (*clean up*) são empregadas para preparação das amostras, para obter-se identificação e quantificação mais confiáveis (BOONE *et al.*, 1999; KAWAGUCHI *et al.*, 2006; ULRICH, 2000), e ainda extrair analitos com elevadas recuperações.

Quando se deseja conhecer a correlação entre a concentração de um determinado composto e seus efeitos farmacológicos ou toxicológicos, dá-se preferência às amostras de sangue (plasma, soro ou sangue total) para realização da quantificação. Essa matriz também permite detectar compostos antes que estes sejam biotransformados e excretados, imediatamente após sua ingestão (MOELLER *et al.*, 1998; MOELLER, KRAEMER, 2002).

Análise de amostras biológicas usando cromatografia a líquido de alta eficiência é técnica de rotina em laboratórios analíticos, visto que o sistema cromatográfico separa os analitos de compostos interferentes presentes na amostra (HENDRIKS, 2009), e várias

técnicas de preparo de amostras biológicas tem sido descritas para análise em cromatografia a líquido.

6.2 Técnicas de extração de amostras

Antes da realização da análise instrumental, faz-se necessário o pré-tratamento das amostras, etapa relevante do processo, necessária para a seletiva caracterização e confirmação de analitos. As etapas do processo abrangem a extração, a pré-concentração e a purificação (MARTINS; MALAFATTI, 2009; CHANG *et al.*, 2007; FACCHIN; PASQUINI, 1998). Dentre as técnicas mais frequentemente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em matrizes biológicas temos a extração líquido-líquido (ELL), a extração por precipitação de proteína (EPP), a extração em fase sólida (EFS), a microextração em fase sólida (MEFS), a extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Algumas dessas técnicas podem ser melhor entendidas a seguir.

6.2.1 Extração líquido-líquido

A técnica de extração líquido-líquido consiste na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, uma orgânica, e outra aquosa. Com a ELL busca-se melhorar a seletividade de uma técnica de detecção, de forma a separar o elemento de interesse dos constituintes majoritários da matriz, ou livrar a mesma de seus interferentes mais significativos; e ainda, melhorar a sensibilidade, concentrando o analito ou deixando-o isolado numa fase, na qual observa-se o aumento do sinal analítico. A afinidade pelo solvente de extração, a razão das fases e o número de extrações são determinantes para a eficiência do processo. A transferência dos solutos contidos numa solução aquosa para a fase orgânica dá-se pelo contato intensivo entre as duas fases imiscíveis, resultando na formação de espécies neutras do tipo quelatos ou compostos de associação iônica (FACCHIN; PASQUINI, 1998; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

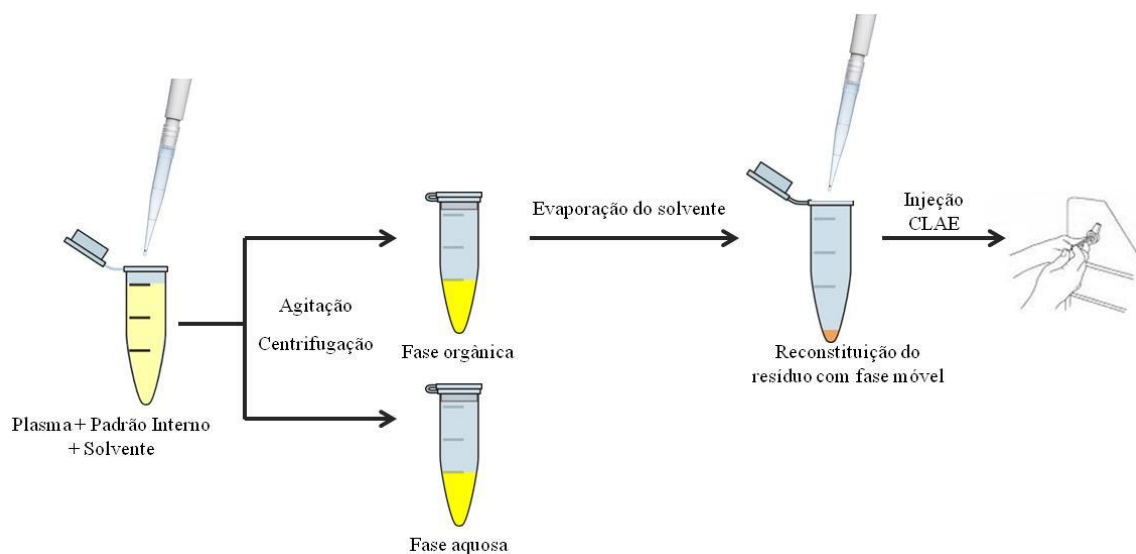
Duas premissas são básicas para a eficiência de recuperação do analito com a ELL, a escolha adequada do solvente orgânico, e o ajuste do pH da amostra. Assim, para a extração de compostos básicos, utiliza-se pH maior que 7, já para substâncias ácidas, pH menor que 5. Há também, uma grande variedade de solventes orgânicos que podem ser

empregados nessa técnica, como o éter dietílico, o acetato de etila, o hexano, o tolueno, o diclorometano, o acetato de butila, e misturas de solventes; sendo a melhor recuperação do analito garantida por sua maior afinidade dele pelo solvente (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A facilidade de operação, o custo relativamente baixo e a variedade de solventes orgânicos que podem ser utilizados tornam a ELL vantajosa. As desvantagens da mesma consistem na produção de resíduos orgânicos, na formação de emulsões durante o processo de extração e as dificuldades de automação. Ainda, é necessário evaporar grandes quantidades de solventes, gerando vapores orgânicos para o ambiente, e baixo nível de repetibilidade/reprodutibilidade das análises (ORLANDO *et al.*, 2009).

Alcaloides como a estricnina, por exemplo, de elevada toxicidade para a espécie humana, pode ser analisado em laboratórios utilizando-se a ELL como técnica de obtenção do analito (CHEN, HOU, FANG *et al.*, 2011). Sua extração pode ser feita usando-se uma mistura de tolueno/n-heptano/álcool isoamílico (67:20:4, v/v/v) para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (MARQUES *et al.*, 2000).

A nicotina, bem como seu metabólito cotinina, é outro alcaloide que tem sua extração realizada pela técnica ELL; usando amostras de plasma heparinizadas e uma solução aquosa de hidróxido de amônio 5 M em cloreto de metileno como mistura extratora, e analisada por sistema de CL-EM-EM (XU *et al.*, 1996). Outro método também empregando ELL para nicotina, cotinina e mecamlamina de plasma, com análise em sistema de CG-EM obteve limites de quantificação de 1, 2 e 2 ng/mL para tais compostos, respectivamente (JACOB *et al.*, 2000). O esquema mostrado na figura 4 a seguir mostra as etapas de extração líquido-líquido:

Figura 4 – Procedimento de extração líquido-líquido

6.2.2 Extração por precipitação de proteínas

A quantificação em amostras bioanalíticas como o plasma requer o rompimento das ligações entre as proteínas da amostra e o composto químico em questão, para assim, conseguir sua total extração para análise. A técnica de precipitação de proteínas é útil para este fim, sendo utilizada para a desnaturação proteica, rompendo a ligação entre a parte proteica e a substância química em análise (POLSON *et al.*, 2003).

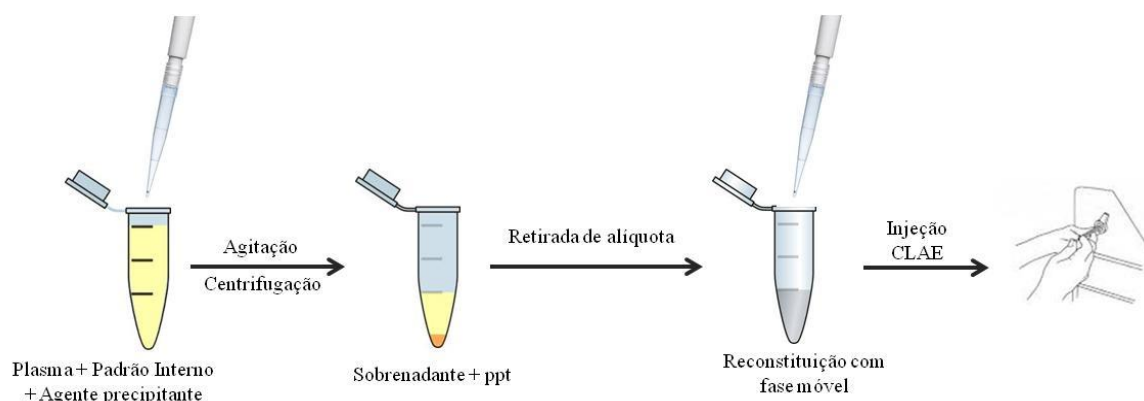
A técnica de extração por precipitação proteica baseia-se na interação entre o solvente e partes das moléculas de proteína. Embora seja uma técnica antiga, ainda é uma das mais populares para preparação bioanalítica de amostras. Geralmente, proteínas solúveis possuem uma parte central hidrofóbica cercada por uma superfície hidrofílica que inclui grupos iônicos que não estão envolvidos em ligações intramoleculares com outra porção iônica de carga oposta (CHANG *et al.*, 2007).

Ácidos e bases modificam o estado de ionização de proteínas. Sais concentrados afetam sua hidratação, e quanto menos hidratadas menor é a solubilidade. Os solventes orgânicos e detergentes neutros interferem com as interações hidrofóbicas intramoleculares de proteínas e também reduzem a hidratação das mesmas. Modificações no pH e na força iônica alteram a ionização de grupos funcionais e a espessura da bicamada lipídica, o que afeta as interações proteína-proteína, promovendo a precipitação (HENDRIKS, 2009; BOULET; BRITTEN; LAMARCHE, 2001; WALSTRA; JENNESS, 1984).

Solventes orgânicos como a acetonitrila e o metanol são os mais comumente usados para a precipitação de proteínas no preparo de amostras de plasma devido ao seu baixo custo e facilidade de uso (MA, 2008). Porém, apesar de ser uma técnica relativamente de fácil execução, a EPP necessita de longos períodos no processo de secagem da amostra; além disso, os extratos obtidos não são suficientemente limpos, gerando possíveis efeitos de matriz (WU, 2011).

Demonstrou-se que alcaloides como berberina, palmatina e jatrorrhizina podem ser extraídos pelas técnicas de ELL e EPP; e um estudo de Liu e colabs. (2011) confirmou que a melhor técnica de extração é a EPP otimizando o uso de agentes precipitantes através de testes com misturas de ácido tricloroacético, ácido fórmico e ácido fosfórico em acetonitrila, chegando a melhor forma de extração com o uso de uma proporção de ácido fórmico a 3 % em acetonitrila. No esquema da figura 5 a seguir verificamos as etapas do processo de EPP:

Figura 5 – Procedimento de extração por precipitação de proteína



6.2.3 Extração em fase sólida

O uso da EFS, para aplicações experimentais pela primeira vez, data de cinquenta anos atrás. Mas seu desenvolvimento como técnica alternativa à ELL para preparação de amostras iniciou-se em meados dos anos 1970; estando entre as técnicas que oferece importantes benefícios na obtenção de analitos em amostras biológicas. A redução do uso de solventes, bem como da exposição aos mesmos, os menores custo e tempo de extração/preparação de amostras podem figurar entre tais (CAMEL, 2003; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; HENNION, 1999).

Em se tratando de análises de produtos naturais, a EFS é frequentemente utilizada para o pré-tratamento de amostras. Se comparada à EPP, ela reduz grandemente os interferentes da matriz biológica, sendo a técnica de escolha para a extração e purificação de analitos por possuir elevada seletividade, rapidez de extração, potencial para automação do processo, e ainda, fazer uso de menores volumes de solventes orgânicos em comparação com extrações líquido-líquido (KANEKO *et al.*, 2006; MURPHY; HUESTIS, 2005). Dentro das classes de produtos naturais preparadas por EFS de fase reversa, podemos incluir o largo uso da técnica para flavonoides, alcaloides, saponinas e sesquiterpenos (LIN *et al.*, 2005; FELGINES *et al.*, 2003; NAIK *et al.*, 2005).

O princípio da EFS é semelhante ao da ELL, envolvendo a partição de solutos entre duas fases. Diferentemente da ELL, que utiliza duas fases líquidas imiscíveis, no caso da EFS, a partição ocorre entre um líquido, que é a matriz da amostra, e um uma fase sólida, que é o sorvente. Com esta técnica, consegue-se tanto a concentração quanto a purificação do analito em solução, pela sorção em sorvente sólido. Basicamente, a EFS consiste em passar uma amostra líquida por uma coluna, um cartucho, um tubo ou um disco contendo o adsorvente, que reterá o analito. Após a passagem de toda a amostra pelo sorvente, os analitos retidos são recuperados através de eluição com solventes apropriados (CAMEL, 2003).

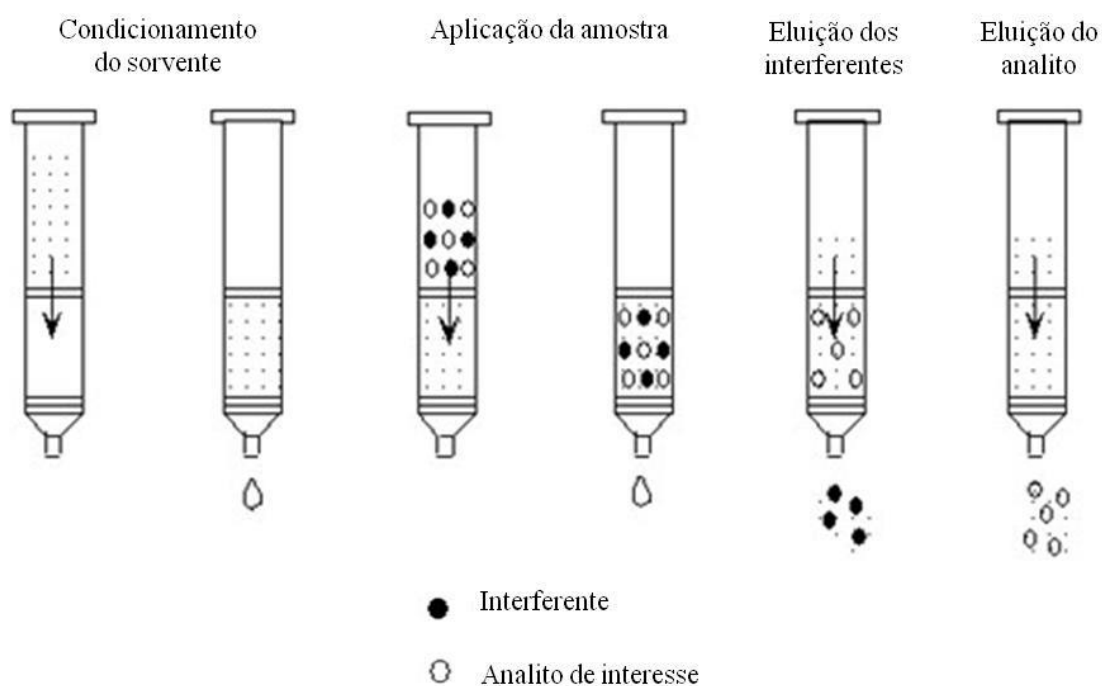
Os cartuchos utilizados na EFS são recheados por uma diversidade de sorventes, e apresentam-se no formato de barris ou seringas, com mecanismos de retenção idênticos aos da cromatografia a líquido em coluna. Um cartucho característico pode ser formado por um tubo de polipropileno contendo entre 50 e 500 mg do sorvente, com tamanho de partícula variando entre 40 e 60 μm , fixado ao tubo através de dois filtros. As etapas que compreendem o processo de extração consistem em: ativação do sorvente para promover a disponibilização dos sítios ativos; condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; introdução da amostra no cartucho; limpeza do cartucho para a retirada de interferentes menos retidos que o analito; eluição e coleta do analito (Figura 5) (LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F., 1997).

Os sorventes de preenchimento dos cartuchos de EFS são semelhantes aos usados em cromatografia a líquido, como carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio, fases quimicamente ligadas e polímeros (copolímero de estireno entrecruzado com

divinilbenzeno, por exemplo). As categorias de sílica quimicamente ligadas utilizadas ainda podem ser subdivididas em: fase reversa (o sorvente é menos polar que o solvente de eluição); fase normal (o solvente utilizado é menos polar que o sorvente) e troca iônica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

O tipo de sorvente, o volume da amostra e o pH, o volume de solvente de eluição são alguns determinantes da eficiência da EFS; ainda assim, a grande variedade de cartuchos e solventes que podem ser empregados fazem a técnica bastante versátil (XING; XIE; LOU, 2007). No esquema da figura 6 a seguir verificamos as etapas do processo de EFS:

Figura 6 – Procedimento de extração em fase sólida



A tabela 1 a seguir exemplifica algumas técnicas de preparo/extração de amostras bioanalíticas de modo comparativo.

Tabela 1 – Comparação entre técnicas de extração de amostras

Técnica	Princípio	Características
Extração Líquido-Líquido	Distribuição do analito entre dois líquidos imiscíveis em função de um coeficiente de partição	<ul style="list-style-type: none"> - Boa reprodutibilidade - Fácil manuseio - Compostos pouco voláteis - Solventes puros, - Grandes quantidades de resíduos
Extração por Precipitação de Proteína	Adição de sais e solventes orgânicos que competem com as proteínas pela água disponível	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica muito simples - Baixo custo - Pouca eficiência na retirada de interferentes - Baixa reprodutibilidade - Perda do analito
Extração em Fase Sólida	Adsorção seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes.	<ul style="list-style-type: none"> - Grande disponibilidade de materiais adsorventes - Altas recuperações, - Baixo consumo de solventes. - Técnica mais cara - Complicada quando realizada manualmente
Microextração em Fase Sólida	Distribuição do analito entre duas fases imiscíveis, a fase extratora é um polímero que reveste uma fibra de sílica	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica versátil - Baixo consumo de solvente - Necessidade de pouca quantidade de amostra - Fibras de extração reaproveitáveis - Limites de quantificação altos - Poucos materiais de extração disponíveis
Extração por Fluido Supercrítico	Solubilização do analito por um fluido no estado supercrítico que depois é coletado em um líquido ou adsorvente	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizada tanto em amostras sólidas, semi-sólidas ou líquidas - Não necessita de solventes Orgânicos - Analito precisa ser solúvel no fluido supercrítico
Extração em Membrana	Permeação seletiva do analito através de uma membrana que separa duas fases líquidas	<ul style="list-style-type: none"> - Eficiente na separação de fármacos de proteínas - Menor capacidade de separação e concentração do analito - Separação mais demorada

FONTE: (adaptado de: RICARDO M. ORLANDO *et al.*, 2009)

Na tabela 2, podemos visualizar alguns métodos de extração de alcaloides relatados na literatura.

Tabela 2 – Métodos de quantificação de alcaloides em matriz biológica relatados na literatura

ALCALOIDE	MATRIZ/ESPÉCIE	PREPARO DAS AMOSTRAS	COLUNA (C, D, P) mm, mm, µm	FASE MÓVEL/ FLUXO (mL/min)	INJEÇÃO (µL)	MODO DE DETECÇÃO	LOD	LOQ	REF.
Thermopsina, retrorsina, anisodamina, gelsemina, gramina, harmina, emetina, sanguinarina, evodiamina, rutaecarpina, wilforina, wilforgine	Urina/Suco gástrico (humano)	ELL (Pré-tratamento com solução tampão de Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH pH 9.6 e extração com acetato de etila)	Thermo Scientific BDS Hypersil-C18 (150; 2,1;2,4)	ACN: Ammonium acetate: Ác. Fórmico 0,2% Fluxo: 0,3	5	CLAE-ESI-EM	0,1 – 0,5 mg/L	0,5 - 5 mg/L	(CHUN-HUA <i>et al.</i> , 2012)
Piplartina	Plasma (rato)	ELL (Tolueno)	NST 18 (250; 4,6; 5) LiChrospher® 100 RP18 (coluna guarda, 4; 4; 5)	MeCN:H ₂ O (70:30) Ác. Acético 0,2% Fluxo: 1,0	20	CLAE-EM-EM			BEZERRA <i>et al.</i> , 2011
Escopolamina	Cabelo (humano)	Suspensão de Gotícula em Microextração de Fase Líquida (SDLME)	Knauer RP-18 (250; 4,6) RP-18 (coluna guarda)	H ₂ O:MeOH:MeCN (80:10:10) Fluxo: 1,0	10	EM-EM	0,1 ng/mL	10 ng/mL	MASROURNI A <i>et al.</i> , 2011
Wilfortrine, wilfordine, wilforgine and wilforine	Plasma (Humano)	Cartucho SPE-Oasis MCX	Shim-pack XR-ODS II column (100; 2,0; 2,2)	ACN: Ammonium acetate: Ác. Acético 0,2% (90/10, v/v) Fluxo: 0,3	20	CLAE-EM	0,2 µg/L	0,5 µg/L	Mei-qiang Cai <i>et al.</i> , 2011
Nicotina	Urina/Plasma (humano)	Cartucho SPE-Oasis MCX	Supelco PA (100; 4,6; 3)	Acetato de amônio:Ác. fórmico:MeOH (gradiente) Fluxo: 0,6	-	EM-EM ESI	0,75 ng/mL (plasma) 1,0 ng/mL (urina)	1,0 ng/mL (plasma) 2,5 ng/mL (urina)	E.I. MILLER, <i>et al.</i> , 2010
Cefarantina	Plasma	EPP	Agilent XDB-C ₈	Acetato de	10	HPCLAE-	-	0,5 ng/mL	HAO <i>et al.</i> ,

	(humano)	(Metanol)	(150; 2,1; 5)	amônio:H ₂ O:Ác. Fórmico:Metanol		EM/EM			2010
						ESI			
Neferina	Tecidos/Plasma (ratos)	ELL (Éter dietílico)	Hypersil BDS- C ₁₈ (250; 4,0; 5)	MeOH:KH ₂ PO ₄ :NaO H:TEA (71:17:12:0,002) Fluxo: 0,8	20	EM	-	0,03 mg/mL (plasma) 0,06 mg/mL (fígado)	XIANG, <i>et al.</i> , 2007
Aconitum	Urina (humano)	EFS Cartucho SPE-C ₁₈	Hypersil BDS-C ₁₈ (150; 4,6; 5)	MeCN:H ₂ O:Ác. fórmico (50:50:1) Fluxo: 0,5	50	CLAE-ESI-EM	-	-	ZHANG, <i>et al.</i> , 2005
Efedrina, pseudoefedrina, norefedrina, norpseudoefedrina, metilefedrina, metilpseudoefedrina	Urina/plasma (humano)	EFS Cartucho SCX SPE 500 mg Resina	Phenomenex, Torrence CA (150; 4,6; 4)	MeOH:KH ₂ PO ₄ (97:3) Fluxo: 1,5	20	-			ROMAN, <i>et al.</i> , 2004
Arecolina	Mecônio, urina, soro umbilical	ELL (clorofórmio/isopro panol)	C ₈ Fase reversa	Acetato de amônio:Acetonitrila (90:10)	-	CLAE-ESI-EM	-	-	PICHINI <i>et al.</i> , 2003
Harmina, harmalina, tetrahydroharmina	Plasma (humano)	EPP (Acetonitrila)	Supelcosil LC-DB-8 (150; 4,6; 5)	MeOH:MeCN:acetat o de amônio 0,1 M pH 6,9 (20:20:60) Fluxo: 2,0	50	CLAE- Fluorescência	Harmina: 0,1ng/mL Harmalina: 0,05ng/mL THH: 0,1 ng/mL	Harmina: 2 ng/mL Harmalina: 1,0 ng/mL THH: 1,9 ng/mL	CALLAWAY <i>et al.</i> , 1996

Capítulo I

Obtenção de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. por CLAE-PREP

7 INTRODUÇÃO

O recente interesse pela descoberta de fármacos utilizando-se a modelagem molecular, a química combinatória e outros métodos de síntese química não deixam menos importantes os compostos derivados de Produtos Naturais, que ainda têm demonstrado seu valor como fontes de medicamentos. Além do uso diretamente como fontes medicinais, esses compostos podem servir de precursores, modelos para modificação sintética, além de testes farmacológicos (DUSHENKOV, V., RASKIN, I., 2008; CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; *et al.*, 2006)

As etapas de isolamento e determinação estrutural de metabólitos secundários de organismos vivos detêm grande importância para o desenvolvimento científico da Química de Produtos Naturais, além de contribuírem para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas do país. No Brasil, esse tipo de pesquisa tem envolvido uma gama de pesquisadores que reconhece o potencial relevante da diversidade natural desse Estado-continente para o desenvolvimento também social e econômico.

O metabolismo das plantas é complexo e envolve reações com diferentes mecanismos que colaboram para sua defesa contra patógenos, daí a riqueza de produtos advindos dessas e de outras fontes naturais, como organismos marinhos, microrganismos e animais, por exemplo. Inúmeros são os representantes dos reinos animal e vegetal que têm seus metabólitos identificados e isolados para determinação de suas atividades, e ainda há muito por vir (RASKIN *et al.*, 2002).

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Substâncias e reagentes

Para realização de marcha de isolamento de alcaloides para a *Cissampelos sympodialis* Eichl. foram utilizados como solventes: etanol 96° GL (Toscano); etanol (Merck); água destilada; água purificada (Elga Purelab Option-Q); ácido clorídrico, HCl a 3%; (Merck); hidróxido de amônio, NH₄OH, (Merck); clorofórmio, CHCl₃, (Vetec); metanol grau HPLC, CH₃OH, (Merck); sulfato de sódio anidro, NaSO₄, (Merck); sílica gel 60 PF₂₅₄ (M= 60,09 g/mol) com gesso para CCDA, (Merck); óxido de alumínio 90 (Al₂O₃) (M= 101,94 g/mol) (Brockman, Merck).

8.2 Material vegetal

8.2.1 Obtenção da warifteína e metil-warifteína das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

As raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) utilizadas neste trabalho foram coletadas no horto das dependências do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em João Pessoa, em maio de 2010. A escolha das raízes para uso deu-se em função da maior quantidade dos componentes desejados estarem presentes nessa parte da planta (BARBOSA FILHO *et al.*, 1997). A identificação botânica foi realizada pela botânica Prof. Dra. Maria de Fátima Agra, e uma amostra encontram-se depositada no herbário Lauro Pires Xavier desta universidade com o código Agra 1456.

8.2.2 Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes da planta

As raízes (rz) frescas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. foram secas em estufa com ar circulante a 40 °C e trituradas. Em seguida, submeteu-se o pó seco (4.000 g) a uma série de macerações sucessivas, com intervalo de 72 h entre cada uma das macerações, perfazendo um total de dez. O solvente de extração utilizado foi o etanol a 70 % com adição de hidróxido de amônia para basificação do meio, procedendo-se a primeira extração adicionando-se inicialmente a amônia (cerca de 1.000 mL) ao pó seco, passando-se 24 h para então adicionar o etanol (cerca de 3.000 mL) e aguardar por mais 48 h para a retirada do líquido extraído. Esse processo foi repetido por nove vezes, de acordo com a observação de teste de Dragendorff fracamente positivo. Uma última extração foi realizada procedendo-se à agitação da massa da planta juntamente com os solventes em sonicador (Bransonic, 1510-MT), por um período de 30 minutos, porém, esse procedimento não contribuiu para a melhora do processo extrativo, visto não ter ocorrido alteração na coloração do líquido extraído. Dessa forma, considerou-se finalizada a etapa de obtenção do extrato etanólico (EEtOH) de *Cissampelos sympodialis* Eichl. A solução de EEtOH obtida foi evaporada a pressão reduzida em rotaevaporador (Büchi, R-215) a 60 °C resultando em um extrato etanólico bruto das raízes (EEBrz) concentrado de coloração castanha (419,27 g, 10,48% m/m em relação ao peso das raízes secas), odor levemente

adocicado, e consistência de uma massa firme. O mesmo foi submetido a uma marcha para isolamento da fração de alcaloides terciários totais (FATT-rz).

8.2.3 Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

O isolamento da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. a partir do EEBrz (419,27 g) consistiu em adicionar à massa do mesmo, uma solução de ácido clorídrico a 3,0 % (1.000 mL) sob agitação mecânica até obtenção de faixa de pH 2,0-3,0. Seguiu-se a filtração da solução ácida em funil de Buchner com celite, a qual foi submetida a várias extrações com clorofórmio (cerca de 500 mL a cada extração), objetivando remover principalmente as graxas e outras impurezas apolares. A fase clorofórmica foi reservada. Com a fase aquosa ácida, realizou-se a basificação da mesma com hidróxido de amônio sob agitação mecânica (agitador mecânico com suporte Fisatom, modelo 715) até obtenção de pH 9,0, quando procedeu-se a extração exaustiva com clorofórmio até que a reação para alcaloides com o reagente de Dragendorff não mais fosse positiva. Descartou-se a fase aquosa básica, e realizou-se a lavagem da fase clorofórmica com água, secando-se com sulfato de magnésio anidro, e em seguida, filtrou-se e evaporou-se a mesma em rotaevaporador a 60 °C, obtendo-se, assim, a fração de alcaloides terciários totais das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (FATT-rz) (91,24 g, 21,76 % em relação ao peso do EEBrz).

8.2.4 Isolamento de warifteína, metil-warifteína e outros constituintes de *C. sympodialis* Eichl. em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-PREP)

Para isolar os alcaloides warifteína e metil-warifteína, foram realizadas corridas cromatográficas em equipamento de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com as seguintes especificações: CBM-20A Prominence Communications Bus Module UFLC Shimadzu, DGU-20A5 Prominence Degasser Shimadzu, Bombas LC-6AD, SPD-M20A Prominence Diode Array Detector Shimadzu, CTO-20A Prominence Column Oven Shimadzu, utilizando uma coluna preparativa de fase reversa Luna C₁₈, (25,0 x 21,20 cm, 5 µm, Phenomenex). O método utilizado consistiu em gradiente de 0-15 min (75 %), 15-20

min (80 %), 20-25 min (100 %), λ máximo de 278 nm, com fase móvel de metanol e água, ambos basificados com amônia para pH 8,0; o fluxo foi de 5,0 mL/min e o tempo total de corrida foi de 20 minutos. O isolamento foi realizado a partir de injeções da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. sendo a massa de FATT-rz injetada por cada corrida cromatográfica na coluna de 800 mg (através de um volume de injeção de 500 μ L de uma solução de FAT a 400 mg/mL, preparada em uma mistura de água e metanol (1:4); coletando-se dez picos (incluindo a warifteína e a metil-warifteína). O material coletado foi seco em rotaevaporador e transferido para recipientes de vidro; e no caso da WAR, procedeu-se filtração da fração à vácuo em funil de Buchner (300 mm) com papel de filtro gerando um pó amarelo que ficou sob vácuo até secar por completo (cerca de 60 min), e transferido para vidro adequado. A massa obtida de warifteína seca foi de 0,9355 g (46,78 % m/m em relação ao peso da FATT-rz) e a de metil-warifteína foi 0,1661 g (8,30 % m/m em relação ao peso da FATT-rz).

8.5 Caracterização espectroscópica

A análise de infravermelho foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola da UFPB com o intuito de confirmar os grupos químicos presentes nos alcaloides previamente isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl. A obtenção dos espectros foi por transformada de Fourier (FT-IR) em equipamento espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu, modelo Prestige 21, com amostras dispersas em pastilhas de KBr.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para os alcaloides warifteína e metil-warifteína foram realizados em espectrômetro da marca Varian Systems de 200 e 500 MHz, respectivamente, em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para substância inédita CS5 foram realizados em espectrômetro da marca Bruker DPX300 de 300 e 75 MHz, respectivamente, em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de São Paulo (USP).

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em equipamento espectrômetro de massas da marca Bruker em modo de ionização electrospray positivo (ESI+). A concentração das amostras de alcaloides foi de 1 µg/mL em metanol:água (50:50), injetadas por infusão direta usando uma bomba de infusão com seringa e os espectros escaneados de uma faixa de massas de m/z 70 a 1000 Da, utilizando-se os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 4.5 KV, pressão do gás de nebulização de 8,0 psi e temperatura de 220 °C. Os espectros foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB).

Os experimentos em sistema de cromatografia a líquido acoplado a espectrometria de massas de baixa resolução (CLAE-EM) foram realizados em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em sistema de CLAE da marca Shimadzu com os seguintes módulos: Communication Bus Module (CBM-20A Prominence UFLC), degaseificador (DGU-20A3 Prominence degasser), dois módulos LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph UFLC, SIL-20AC HT Prominence Autosampler. As condições cromatográficas foram: colunas cromatográficas de fase reversa das marcas Gemini-NX, C₁₈, dimensões 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm; e ACE, C₈, dimensões 125 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm, volume de injeção 30 µL, fase móvel acetonitrila e água com adição de ácido fórmico 0,2 % na proporção de 82:18 (v/v) e pH 2,5. Equipamento de espectrometria de massas da marca API 3200 com os seguintes parâmetros: Curtain gas (CUR) = 20; Collision gas (CAD) = 26; Ion Spray (IS) = 3000; Temperatura (TEM) = 600 °C; Gas Nebulizer (GS1) = 45; Turbo gas (GS2) = 50; Capilar = 3,5; Cone = 43; Extrator = 4; RF Lens = 0,1.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Isolamento dos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

9.1.1 Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes *Cissampelos sympodialis* Eichl. para a produção de fração de alcaloides terciários totais

A sistemática seguida para a obtenção do extrato etanólico bruto das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl., e em seguida, a fração de alcaloides terciários totais, neste trabalho, sofreram alguns ajustes objetivando aumentar o rendimento dos constituintes

isolados comumente na planta. A escolha das raízes para o isolamento de warifteína deu-se em função da maior quantidade desse alcaloide nessa parte da planta.

Em extrações anteriores, procedia-se à maceração do material seco da planta somente com adição do solvente extrator, neste caso etanol 70 %. Uma vez que os alcaloides são de natureza básica, adicionou-se ao pó seco, antes mesmo do solvente extrator, hidróxido de amônia para basificação do meio, e só então, adicionou-se o etanol para dar continuidade à extração. Assim, o procedimento consistiu em basificação por 24 h e depois extração por 48 h, repetindo-se o processo por 9 nove vezes

Dessa forma, o tempo total de extração foi de 648 h, maior que o relatado para a mesma marcha em outros trabalhos, como Marinho (2008), que relata o período de extração por 504 h e um intervalo de uma semana entre cada uma das extrações, perfazendo um total de três; sendo esta outra diferença, pois foram realizadas ao total dez extrações por maceração e uma em aparelho sonicador. Porém, esta última não mostrou maior eficiência ao final do processo, visto não ter havido alteração na coloração da amostra, nem maior positividade para o teste de alcaloides, que era realizado a cada extração.

Comparando-se os rendimentos obtidos para o processo, conseguiu-se maior quantidade de FATT-rz com essa marcha, sendo possível obter 91,24 g, correspondendo a um rendimento de 21,76 % (m/m), quando Marinho (2008) relata um rendimento de apenas 3,3 % (m/m) para a mesma FATT-rz. Na figura 7 temos a marcha realizada no trabalho de Marinho (2008) e na figura 8, a marcha realizada nesse trabalho.

Figura 7 Esquema de marcha sistemática para isolamento da fração alcalóides terciários totais de *Cissampelos sympodilais* Eichl. (FONTE: MARINHO, 2008)

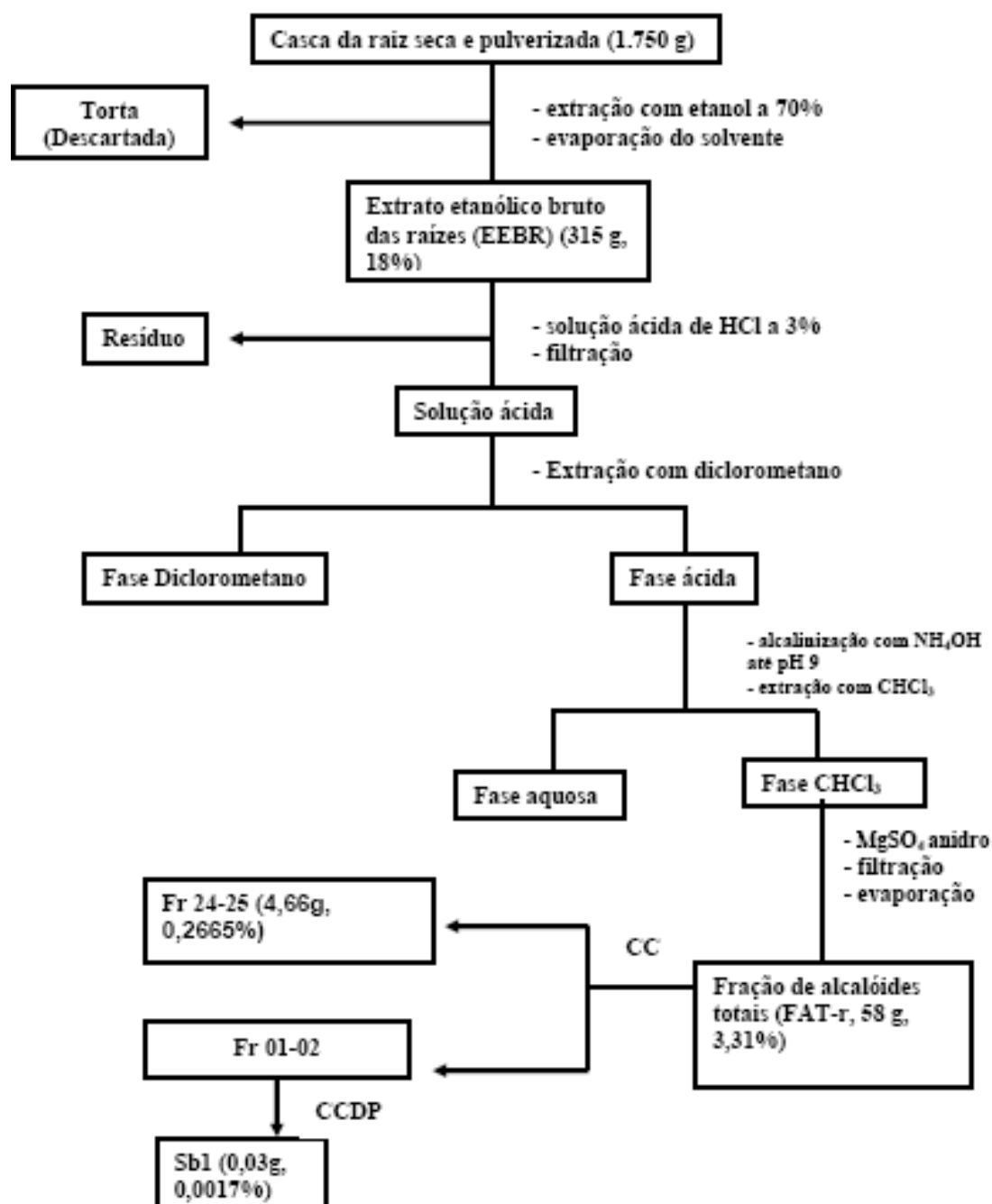
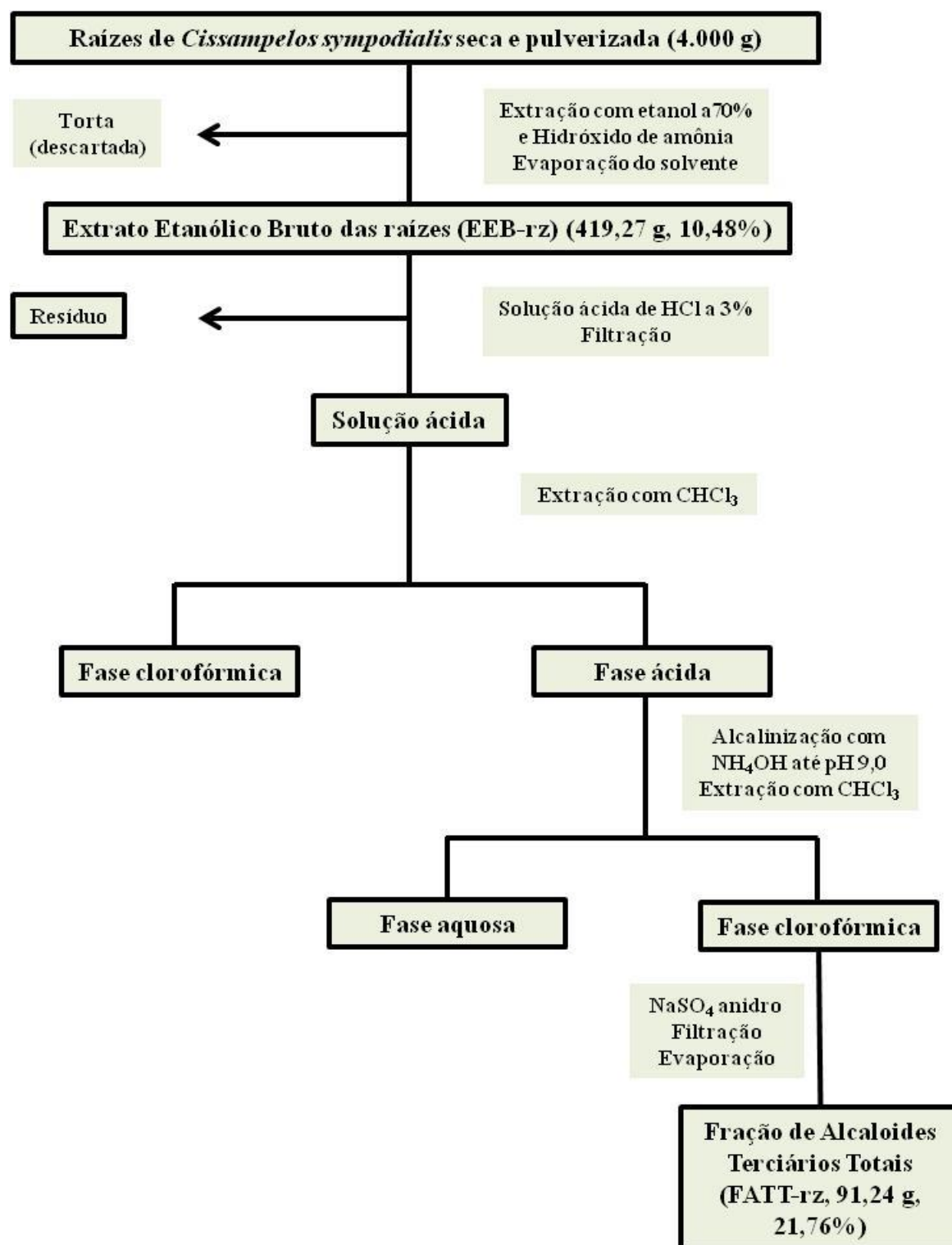


Figura 8 Esquema de marcha sistemática para isolamento da fração alcaloides terciários totais de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (FONTE: MEDEIROS, 2013)



9.1.2 Isolamento de warifteína, metil-warifteína e outros constituintes de *C. sympodialis* Eichl. em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Preparativa com detector de arranjo de diodo (CLAE-PREP-UV/DAD)

O isolamento dos alcaloides warifteína e metil-warifteína, comumente, é realizado após a obtenção da fração de alcaloides terciários totais através de cromatografia em coluna (CC) e de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (MUKHERJEE, 2003).

Após a obtenção da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. partiu-se para o isolamento desses alcaloides através de metodologia em CLAE-PREP-UV/DAD, almejando-se, assim, a obtenção destes alcaloides em grau elevado de pureza, bem como em quantidade maior; além disso, sempre é possível, conjuntamente, o isolamento de outros constituintes.

Inicialmente, foram realizadas corridas em coluna analítica de fase reversa de forma a verificar o comportamento da FATT-rz; a escolha da fase móvel foi em função da polaridade do analito e também de análises prévias com o material. Assim, foi possível um pré-ajuste de fase móvel e tempo de retenção dos analitos (warifteína e metil-warifteína). As proporções de fases móveis utilizadas podem ser visualizadas nas tabelas de 3 a 6 a seguir, bem como os cromatogramas referentes a cada um dos gradientes avaliados.

Tabela 3 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Tempo (minutos)	Metanol (%)
0,01	10
5	20
15	40
20	60
25	80
30	100
33	100

O gradiente utilizado de acordo com a tabela 3 gerou um cromatograma representado na figura 9, no qual pode-se observar dois picos predominantes, um deles sendo o da warifteína (Tempo de retenção (T_r) = 20,64 min); porém, o pico apresentou um leve “ombro” sugerindo a coeluição de mais uma substância. Além disso, não foi possível,

com este gradiente, a separação efetiva de outros componentes que devem estar presentes na amostra.

Figura 9 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em coluna analítica de fase reversa com sistema de eluição metanol e água, em gradiente 0 a 5 min (10 %), 5 a 15 min (20 %), 15 a 20 min (40 %), 20 a 25 (60 %), 25 a 30 (80 %), 30 a 33 min (100 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 20,64 min.

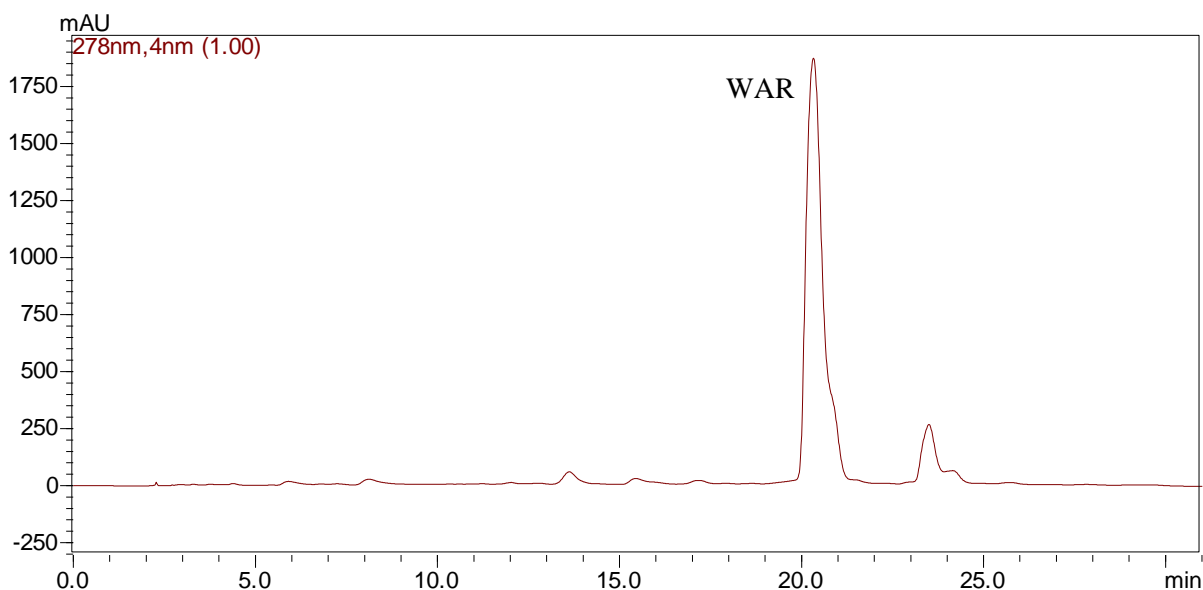
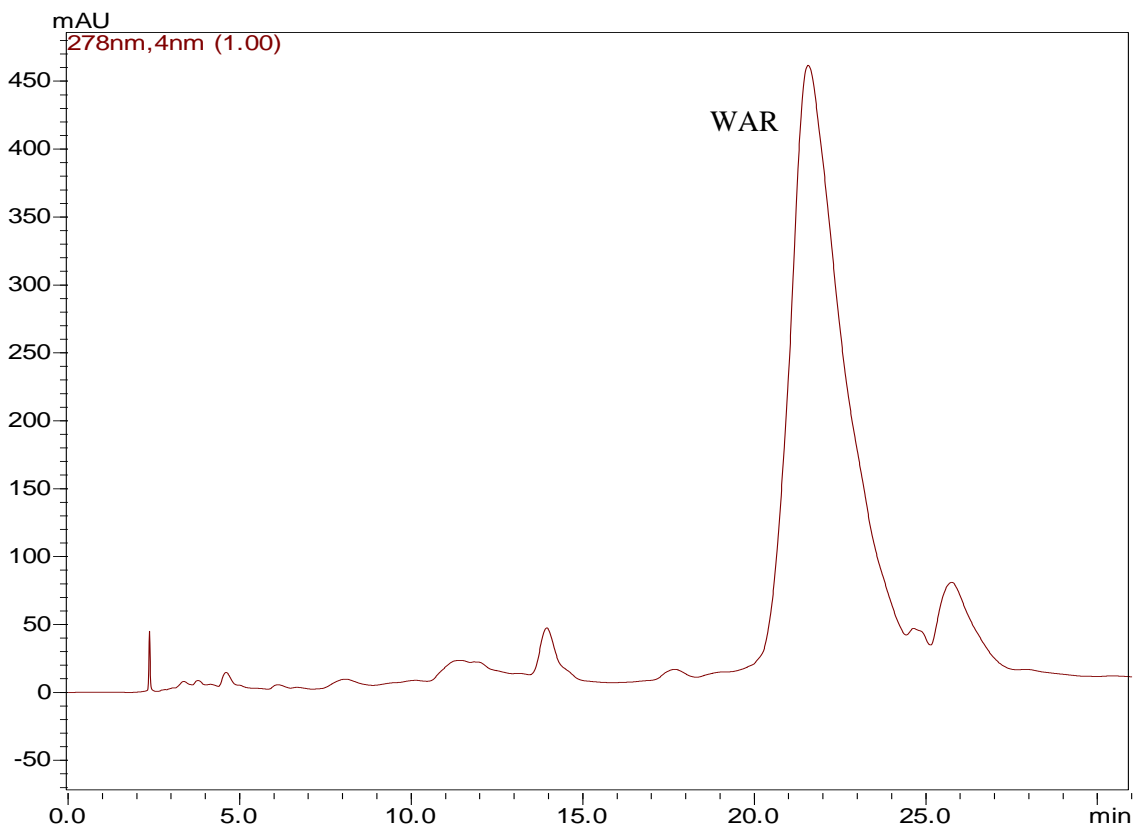


Tabela 4 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Tempo (minutos)	Metanol (%)
0,01	40
5	60
15	80
20	90
25	100
30	100

Para o gradiente utilizado segundo a tabela 4, observa-se o cromatograma apresentado na figura 10. No mesmo, visualiza-se também a presença da warifteína (Tr = 22,01 min) como alcaloide em maior concentração, mas o gradiente utilizado promoveu um alargamento do pico, além de ter antecipado o pico que sai em tempo posterior ao da warifteína para muito próximo e ter havido coeluição.

Figura 10 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em coluna analítica com sistema de eluição metanol e água, em gradiente 0 a 5 min (40 %), 5 a 15 min (60 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 (90 %), 25 a 30 (100 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 22,01 min.



De acordo com o comportamento dos analitos da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em função dos gradientes testados ainda em coluna analítica, fizemos um ajuste do pH da fase móvel para um valor de 8,0 (usando-se amônia tanto na água como no metanol), para o gradiente representado na tabela 5.

Tabela 5 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 30 minutos em sistema CLAE analítica de fase reversa com amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Tempo (minutos)	Metanol (%)
0,01	60
5,00	60
5,01	72
15,00	72
15,01	80
25,00	80
25,01	60
30,00	60

O terceiro gradiente analisado, representado na tabela 5, agora com o pH dos eluentes ajustados para 8,0; gerou o cromatograma mostrado na figura 11. A warifteína teve seu tempo de retenção antecipado para 9,96 min, e apesar do pico ter apresentado melhor definição e simetria, se comparado aos picos para a warifteína obtidos nos cromatogramas representados nas figuras 9 e 10 com os gradientes anteriores (Tabelas 3 e 4) e sem ajuste do pH da fase, ainda houve coeluição de uma substância. Porém, foi possível a melhor separação de outros componentes presentes em menor concentração que aparecem num tempo de retenção anterior ao da warifteína, além da separação do pico para a metil-warifteína, que eluiu no tempo de retenção de 12,9 min. Dessa forma, permaneceu-se com o ajuste de pH da fase móvel para um valor de 8,0, partindo-se para a avaliação em coluna preparativa.

Figura 11 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em coluna analítica de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 5 min (60 %), 5 a 15 min (72 %), 15 a 25 min (80 %), 25 a 30 (60 %), volume de injeção 20 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 9,96 min; Tr (m-WAR) 12,9 min.

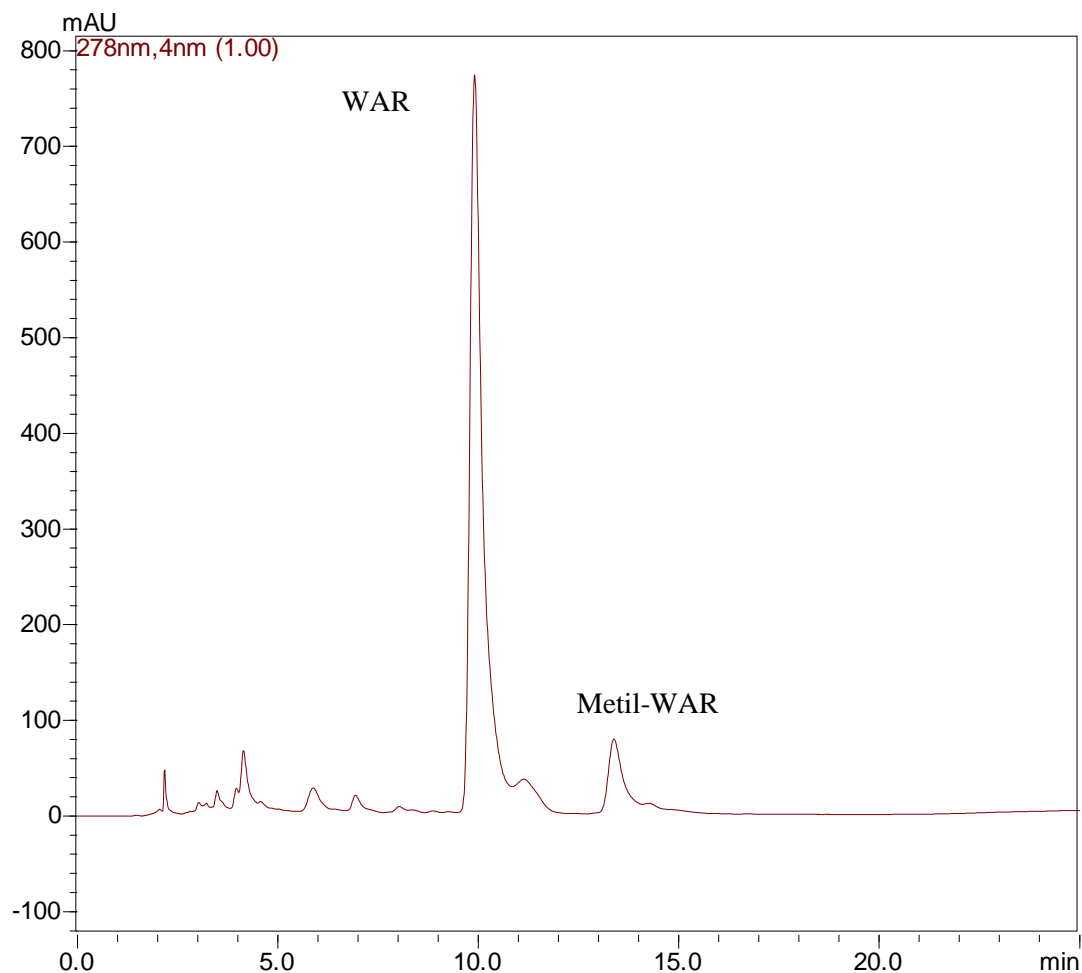
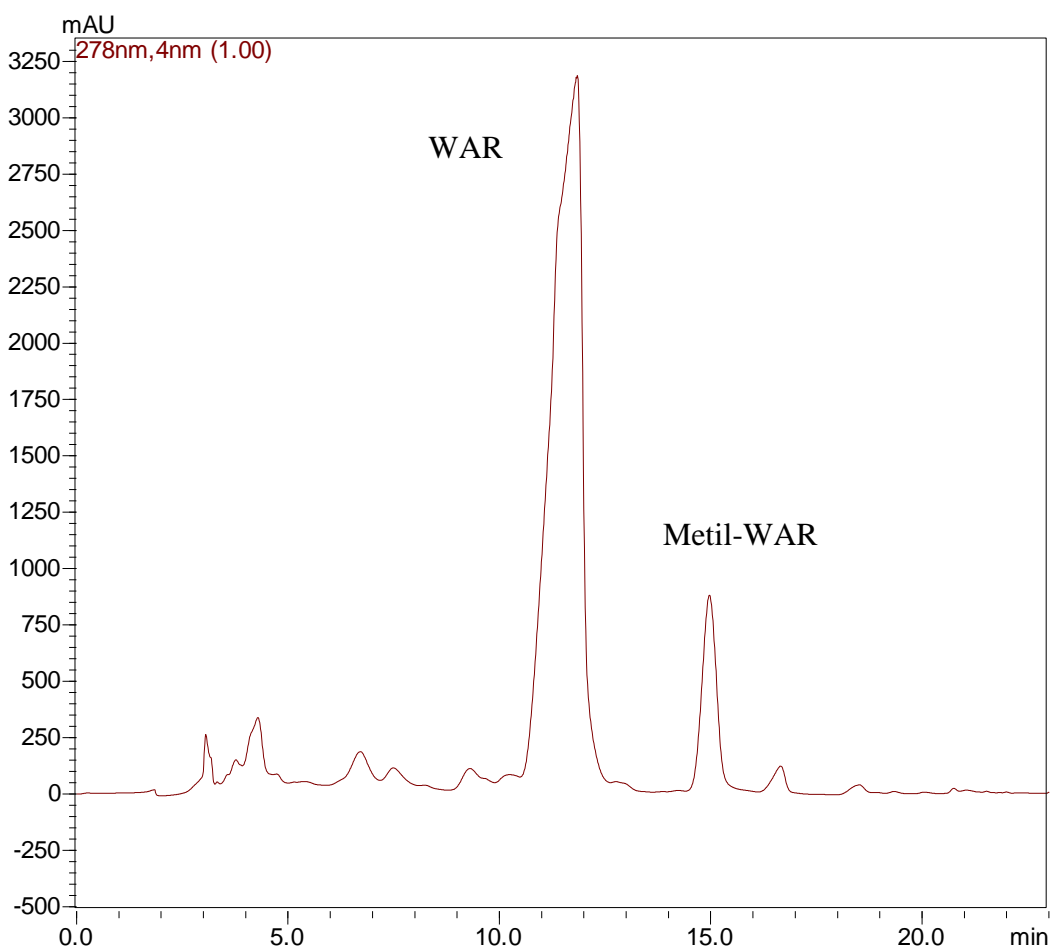


Tabela 6 – Gradiente de fase móvel de metanol e água utilizada em corrida cromatográfica de 20 minutos em sistema CLAE-PREP de fase reversa com amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Tempo (minutos)	Metanol (%)
0,01	75
15,00	80
20,00	100

Após os testes em escala analítica, realizou-se injeção em coluna preparativa, sendo obtido o cromatograma representado na figura 12. A melhora da separação cromatográfica obtida com o gradiente mostrado na tabela 5, além da obtenção dos menores tempo de corrida e tempo de retenção para a warifteína, e a sua separação da metil-warifteína, (representados na figura 11) levou-nos a testar o gradiente mostrado na tabela 6 em CLAE-PREP-UV/DAD, com o pH da fase móvel ajustado para um valor de 8,0.

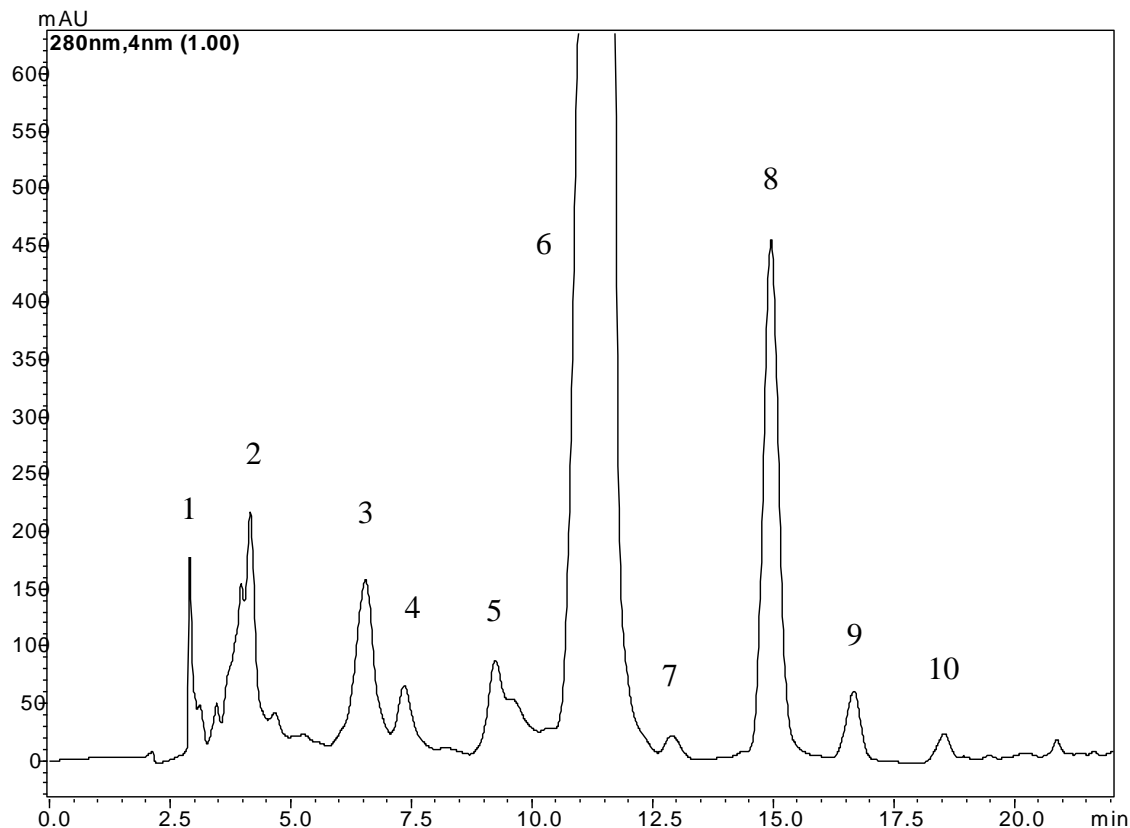
Figura 12 – Cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em coluna preparativa de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 15 min (75 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 min (100 %), volume de injeção 500 µL, λ máximo 280 nm, Tr (WAR) 10,81 min; Tr (m-WAR) 15,03 min.



A transposição do método para a escala preparativa foi eficaz, sendo possível observar os picos para a warifteína (WAR) e para a metil-warifteína (Metil-WAR) completamente separados (Figura 12), com boa simetria, e a ausência de substâncias coeluído com a warifteína, que se apresenta como o alcaloide predominante na amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl., mostrando um pico cromatográfico mais intenso em relação aos outros constituintes visualizados, até mesmo a metil-warifteína.

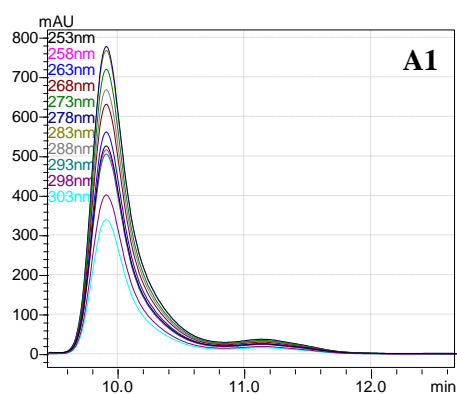
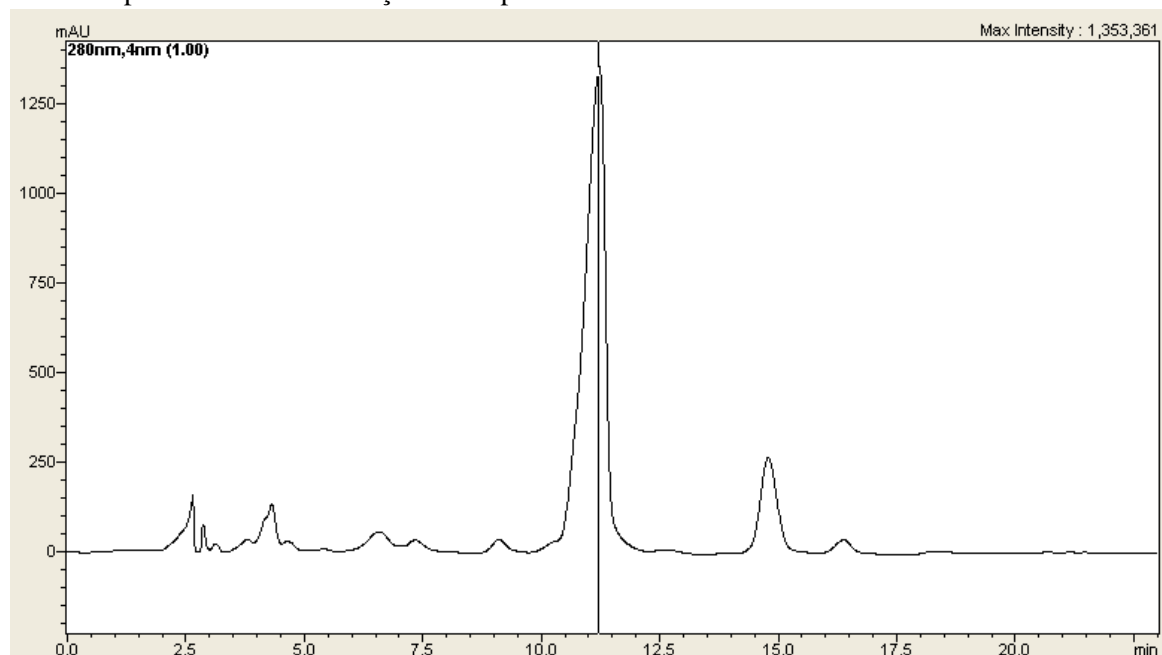
Por este método, foi possível ainda, isolar outros constituintes presentes na FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl., os quais estão representados na figura 13 numa ampliação do cromatograma anterior (Figura 12). Dentre esses constituintes temos a mistura de alcaloides Des-7-O-metilroraimina e Epi-des-7'-O-metilroraimina, previamente isolada por Marinho (2012) (pico 3, figura 13), além de duas substâncias, das quais uma delas é inédita (CS5), correspondentes aos picos 5 e 9 (figura 13). Destas substâncias, a correspondente ao pico 5 é inédita e teve sua estrutura elucidada (como veremos no item 9.3, pág. 85), e a correspondente ao pico 9 ainda encontra-se em fase de elucidação estrutural. Para ambas as substâncias foi possível o processo de isolamento e elucidação de estrutura (pico 5) pela parceria com a professora Dra. Tânia Maria Sarmento da Silva.

Figura 13 – Ampliação do cromatograma de injeção de amostra de FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl. em coluna preparativa de fase reversa com sistema de eluição metanol e água (pH 8,0 para os eluentes), em gradiente 0 a 15 min (75 %), 15 a 20 min (80 %), 20 a 25 min (100 %), volume de injeção 500 μ L, λ máximo 280 nm, com os picos isolados incluindo a warifteína (6) e metil-warifteína (8).



Utilizando-se a CLAE-PREP-UV/DAD para isolamento e purificação de warifteína (correspondendo ao pico 6 na figura 13) e metil-warifteína (correspondendo ao pico 8 na figura 13), foi possível um rendimento para a warifteína de 46,78 % (m/m em relação à massa de FATT-rz injetada) e de 8,30 % (m/m em relação à massa de FATT-rz injetada) de metil-warifteína, os quais são referentes às substâncias isoladas puras, como podemos verificar a representação da pureza avaliada em CLAE mostrada nas figuras 14 e 15.

Figura 14 – Análise de pureza para o pico de warifteína realizada em CLAE-UV/DAD com detalhes da variação da faixa de comprimento de onda em A1, curva de perfil de pureza em A2 e absorções do espectro de ultravioleta em A3.



Índice de pureza do pico: 0,997994

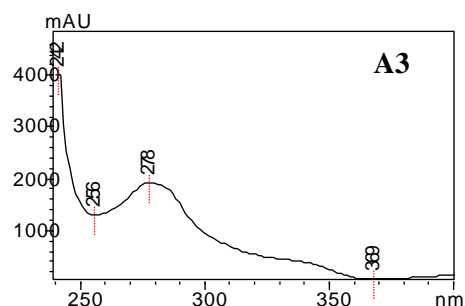
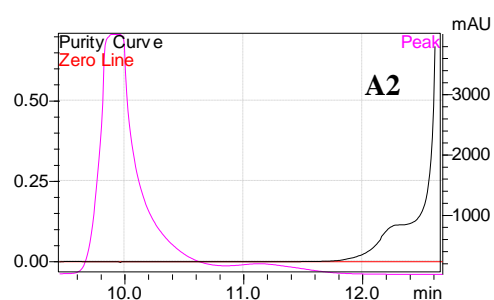
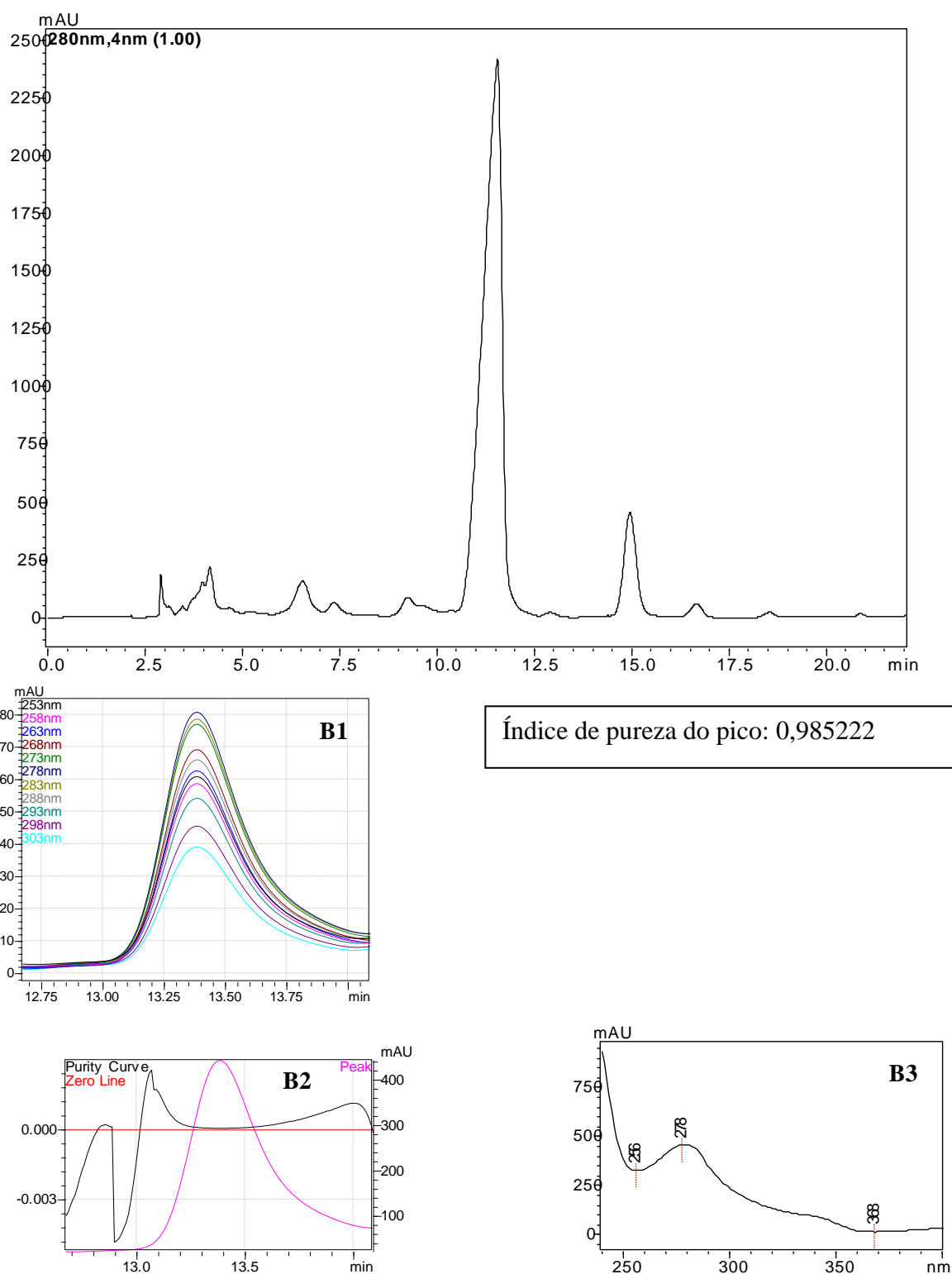


Figura 15 – Análise de pureza para o pico da metil-warifteína realizada em CLAE-UV/DAD com detalhes da variação da faixa de comprimento de onda em B1, curva de perfil de pureza em B2 e absorções do espectro de ultravioleta em B3.



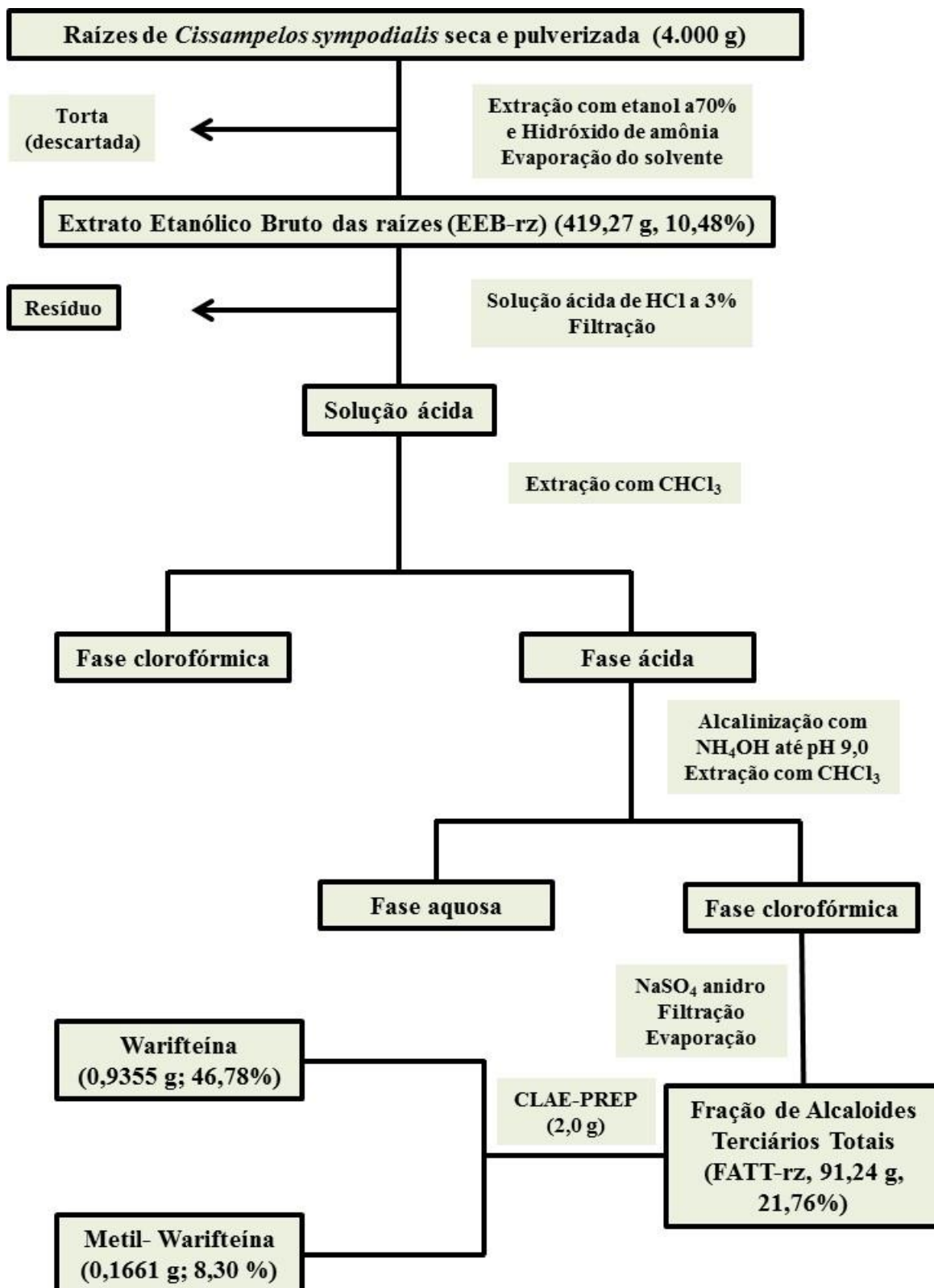
Em CLAE, uma importante ferramenta para a identificação de possíveis interferentes coeluinto com a amostra em análise, e assim diminuindo a resolução dos analitos, é a determinação de pureza do pico. O uso do detector de arranjo de diodos é frequente na determinação desta, pois é possível registrar o cromatograma com diferentes comprimentos de onda simultaneamente na análise cromatográfica, o que fornece mais informação sobre a composição da amostra do que quando se usa um comprimento de onda fixo, permitindo ainda, a aquisição do espectro de ultravioleta de cada pico ao longo de seu comprimento de onda, tornando possível a avaliação da pureza (SNYDER; KIRKLAND; GLAJEH, 1997).

A pureza referente aos alcaloides warifteína e metil-warifteína foi determinada em cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos numa faixa variando entre 253 e 303 nm, utilizando-se a rotina do *software* *LCSolution* do equipamento CLAE conhecida como *Peak Purity*. Esta ferramenta compara os espectros de ultravioleta ao longo do pico cromatográfico com o espectro no ápice do pico, em que um índice de pureza igual a 1,0 é indicativo de grau de pureza de 100 %, enquanto que valores desviantes de 1,0 demonstram picos que co-eluem com impurezas.

Com base nisso, as figuras 14 e 15 mostram o grau de pureza avaliada em CLAE-UV/DAD para os alcaloides isolados warifteína e metil-warifteína, que obtiveram 0,997994 (99,79 %) e 0,985222 (98,52 %), respectivamente, em pureza. Além disso, visualizam-se os picos de acordo com a faixa de variação dos comprimentos de onda, que foi de 253 a 303 nm, em A1 e B1, para a warifteína e metil-warifteína, respectivamente; bem como seus espectros de UV em A3 (WAR) e B3 (Metil-WAR).

Dessa forma, o processo sistemático para isolamento dos alcaloides warifteína e metil-warifteína de *Cissampelos sympodialis* Eichl. pode ser agora representada como no esquema mostrado na figura 16. Com essa marcha, pode-se isolar tanto a WAR quanto a m-WAR partindo-se diretamente da FATT-rz de forma simples, rápida e reprodutível, além de excelente pureza para ambos os alcaloides. Evita-se, assim, a necessidade da realização de cromatografia em coluna aberta com o material da FATT, para só então, proceder ao isolamento e purificação dos alcaloides separados usando CCDP, que não garante pureza tão elevada da WAR, que ainda necessita, após esse processo, ser purificada por recristalização em etanol a quente, como realizou Marinho (2011).

Figura 16 Esquema de marcha sistemática para isolamento dos alcaloides warifteína e metil-warifteína de *Cissampelos sympodialis* Eichl.



(FONTE: MEDEIROS, 2013)

9.2 Dados espectroscópicos

A seguir, apresentam-se os dados espectroscópicos referentes a alguns dos alcaloides isolados e identificados neste trabalho, sendo eles a warifteína, a metil-warifteína e a -7'-O-metilroraimina e seu epímero Epi-des-7'-O-metilroraimina; além da substância inédita CS5.

O isolamento em quantidades maiores e melhor pureza dessas substâncias deram-se através da técnica de CLAE – PREP, que contou com a colaboração da equipe do laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO) da professora Dra. Tânia Maria Sarmento da Silva, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no desenvolvimento do método e isolamento, bem como a identificação da des-metilroraimina e de seu epímero, já previamente isolados por Marinho e *cols.* (2013), e do alcaloide inédito CS5.

9.2.1 Warifteína

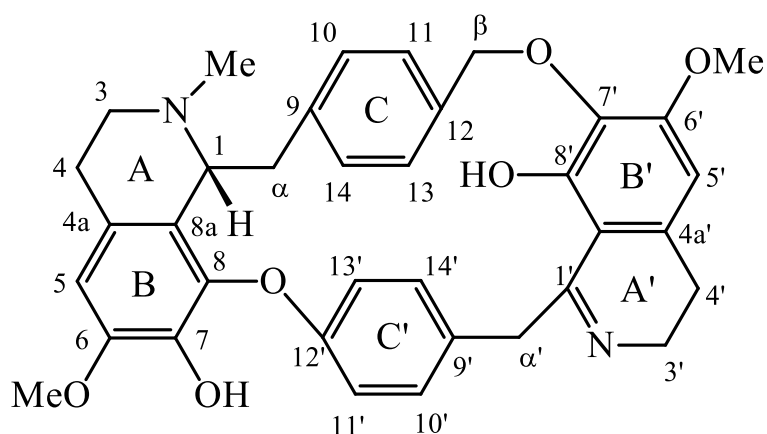
Os dados espectroscópicos obtidos para a warifteína (Figura 17) foram comparados com os da literatura em Mukherjee e Keifer (2003), e estão apresentados a seguir os dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN para hidrogênio e carbono, sendo possível a confirmação do alcaloide warifteína isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl₃, 500 MHz, δ em ppm) para ¹H da warifteína isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: H-1'/H-3: 3,24, H-3/H-15': 2,76, H-4/H-4'/H-15': 2,45, H-5: 6,18, H-10/H-14: 6,78, H-11/H-13: 6,63, H-4': 2,92, H-5': 6,48, H-10'/H-14': 7,09, H-11'/H-13': 6,92, H-16': 5,13, 6'-OMe: 3,91, 6-OMe: 3,86, 2'-NMe: 1,99.

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl₃, 125 MHz, δ em ppm) para ¹³C da warifteína isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: C1: 165,7, C3: 46,0, C4: 27,7, C4a: 135,4, C4b: 109,5, C5: 102,1, C6: 153,0, C7: 130,1, C8: 148,4, C9: 130,7, C10, C14 e C11': 128,6, C11, C13: 114,0, C12: 153,9, C15: 44,2, C1': 59,3, C3': 43,7, C4': 22,8, C4'b ou C4'a: 124,7, C4'a ou C4'b : 124,5, C5': 107,9, C6': 147,8, C7': 138,1, C8': 137,6, C9': 142,6, C10', C14': 128,5, C12': 132,6, C15': 39,7, C16': 74,0, 2'-NMe: 41,7, 6-OMe: 55,4, 6'-OMe: 56,0.

Valor de P.F. 235-236 °C; dados de IV (KBr) V_{\max}/cm^{-1} : as principais bandas de infravermelho para a warifteína, 3452 (característico para estiramento de hidroxila fenólica), 2931 (típica de estiramento da ligação C-H de CH_3), 2846 (estiramento da ligação C-H de CH_2), 1608 (C=C olefínico), 1504 (C=C aromático), 1446, 1300, 1215, 1118, 821; espectro de massas representado na figura 20 (EMESI+ m/z 593,2).

Figura 17 – Estrutura do alcaloide warifteína



9.2.2 Metil-warifteína

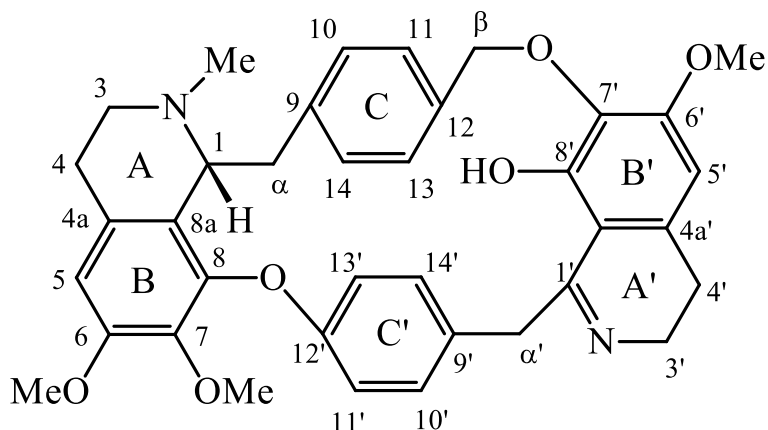
Os dados espectroscópicos obtidos para a metil-warifteína (Figura 18) foram comparados com os da literatura em Mukherjee e Keifer (2003), e estão apresentados a seguir os dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN para hidrogênio e carbono, respectivamente, sendo possível a confirmação do alcaloide metil-warifteína isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Valor de P.F. 200-201 °C; dados de IV (KBr) V_{\max}/cm^{-1} : 3475, 2935, 2843, 1608, 1500, 1446, 1311, 1215, 817; espectro de massas representado na figura 21 (EMESI+ m/z 607,2).

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 500 MHz, δ em ppm) para ^1H da metil-warifteína isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: H-1'/H-3: 3,25; H-3/H-15': 2,76; H-4/H-4'/H-15': 2,51; H-5: 6,16; H-10/H-14: 6,65; H-11/H-13: 6,65; H-4': 2,92; H-5': 6,52; H-10'/H-14': 7,10; H-11'/H-13': 6,91; H-16': 5,21; 6'-OMe: 3,91; 6-OMe: 3,84; 7'-OMe: 3,73; 2'-NMe: 1,98.

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 125 MHz, δ em ppm) para ^{13}C da metil-warifteína isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: C1: 165,3; C3: 42,3; C4: 28,3; C4a: 136,1; C4b: 109,0; C5: 102,6; C6: 155,0; C7: 130,2;

C8:148,0; C9: 131,6; C10, C14 e C11', C13': 129,0; C11, C13: 114,7; C12: 154,8; C15: 45,4; C1': 60,0; C3': 44,3; C4': 23,7; C4'b ou C4'a: 129,3; C4'a ou C4'b: 129,7; C5': 109,4; C6': 152,5; C7': 141,1; C8': 144,9; C9': 142,9; C10', C14', C11', C13': 129,2; C12': 132,2; C15': 39,9; C16': 74,3; 2'-NMe: 40,7; 6-OMe: 56,7; 6'-OMe: 56,1; 7'-OMe: 61,8.

Figura 18 – Estrutura do alcaloide Metil-warifteína



9.2.3 Des-7'-O-metilroraimina e seu epímero Epi-des-7'-O-metilroraimina

Os dados espectroscópicos obtidos para a Des-7'-O-metilroraimina e para a Epi-des-7'-O-metilroraimina (Figura 19) foram comparados com os da literatura em Marinho *et al.* (2013) e estão apresentados a seguir os deslocamentos químicos de RMN para hidrogênio e carbono. O espectro de massas para a mistura de epímeros está representado na figura 22 (EMESI+ m/z 607,0).

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 500 MHz, δ em ppm) para ^1H da Des-7'-O-metilroraimina isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: H-3: 4,23; 3,24; H-4: 2,81; 2,72; H-5: 6,46; H-10: 7,81; H-11: 6,57; H-13: 6,86; H-14: 7,26; H-1': 4,89; H-3': 3,34; 2,95; H-4': 2,75; 2,37; H-5': 6,53; H-10': 6,99; H-11': 6,91; H-13': 6,95; H-14': 6,99; H-15': 2,42; 2,36; H-16': 4,96; 4,64; 6-OMe: 3,95; 6'-OMe: 3,83; 2'-NMe: 2,34.

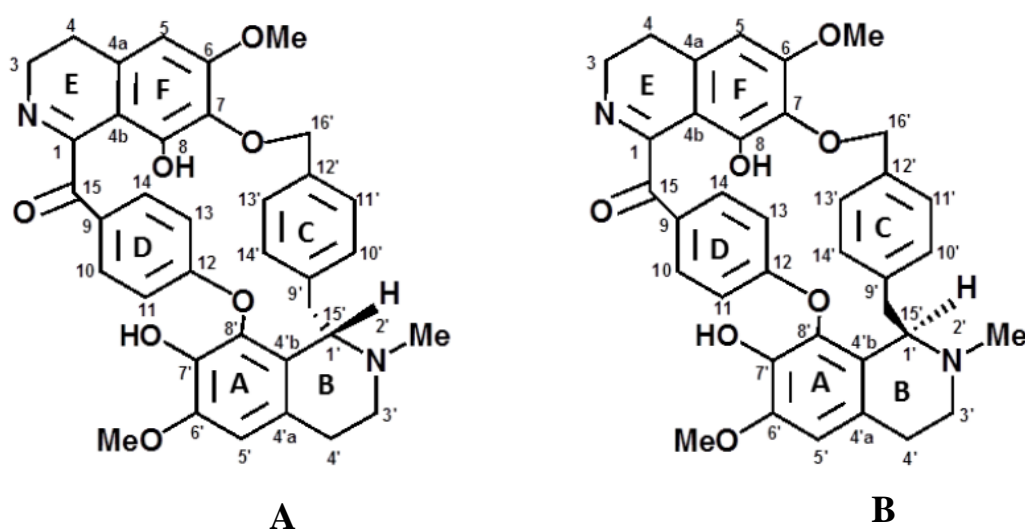
Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 125 MHz, δ em ppm) para ^{13}C da Des-7'-O-metilroraimina isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: C1: 164,59; C3: 46,37; C4: 25,96; C4a: 133,84; C4b: 109,04; C5: 103,01; C6: 154,81; C7: 131,25; C8: 148,54; C9: 129,17; C10: 131,25; C11: 112,19; C12: 160,34; C13:

116,66; C14: 129,17; C15: 191,72; C1': 55,62; C3': 43,91; C4': 24,73; C4'a: 133,84; C4'b: 123,97; C5': 108,90; C6': 147,56; C7': 138,07; C8': 136,70; C9': 140,62; C10': 128,60; C11': 128,26; C12': 133,66; C13': 128,26; C14': 129,17; C15': 38,41; C16': 73,21; 6-OMe: 55,80; 6'-OMe: 55,91; 2'-NMe: 42,87.

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 500 MHz, δ em ppm) para ^1H da Epi-des-7'-O-metilroraïmina isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: H-3: 4,01; 3,24; H-4: 2,67; 6,39; H-5: 7,81; H-10: 6,57; H-11: 6,86; H-13: 7,15; H-14: 2,99; H-1': 3,34; H-3': 2,95; H-4': 2,75; H-5': 6,53; H-10': 6,99; H-11': 6,91; H-13': 6,95; H-14': 7,23; H-15': 2,67; H-16': 4,89; 4,85; 6-OMe: 3,95; 6'-OMe: 3,86; 2'-NMe: 2,26.

Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN (CDCl_3 , 125 MHz, δ em ppm) para ^{13}C da Epi-des-7'-O-metilroraïmina isolada de *Cissampelos sympodialis* Eichl.: C1: 164,59; C3: 46,37; C4: 25,96; C4a: 133,84; C4b: 109,04; C5: 103,01; C6: 154,97; C7: 131,25; C8: 147,46; C9: 129,17; C10: 131,25; C11: 112,19; C12: 159,58; C13: 116,66; C14: 129,17; C15: 191,72; C1': 60,23; C3': 43,02; C4': 25,96; C4'a: 125,91; C4'b: 122,91; C5': 109,04; C6': 147,22; C7': 137,67; C8': 137,41; C9': 142,30; C10': 128,55; C11': 129,10; C12': 133,84; C13': 129,17; C14': 129,10; C15': 39,79; C16': 73,10; 6-OMe: 55,62; 6'-OMe: 55,87; 2'-NMe: 40,97

Figura 19 – Estruturas dos alcaloides Des-7'-O-metilroraïmina e Epi-des-7'-O-metilroraïmina



9.2.4 Espectrometria de massas

O espectro de massas em baixa resolução (ESI-EM) obtido para a warifteína em modo positivo (Figura 20) possibilitou confirmar a fórmula molecular da substância ($C_{36}H_{36}N_2O_6$), demonstrando a formação do íon molecular m/z 593, condizente com a mesma adicionada à massa de hidrogênio na formação do íon $[M + H]^+$ pela protonação característica da ESI. O pico referente ao íon filho formado em m/z 489, referente à expulsão de um fragmento *p*-xileno (C_8H_8) característico dessa classe de alcaloides, corrobora com os dados observados na literatura (MUKHERJEE & KEIFER, 2003).

Similarmente, confirmou-se também a fórmula molecular para a metil-warifteína ($C_{37}H_{38}N_2O_6$), com formação do íon molecular m/z 607, referente à substância, bem como de seu íon filho m/z 503 (Figura 21), novamente formado devido à expulsão característica do fragmento (C_8H_8) desses alcaloides.

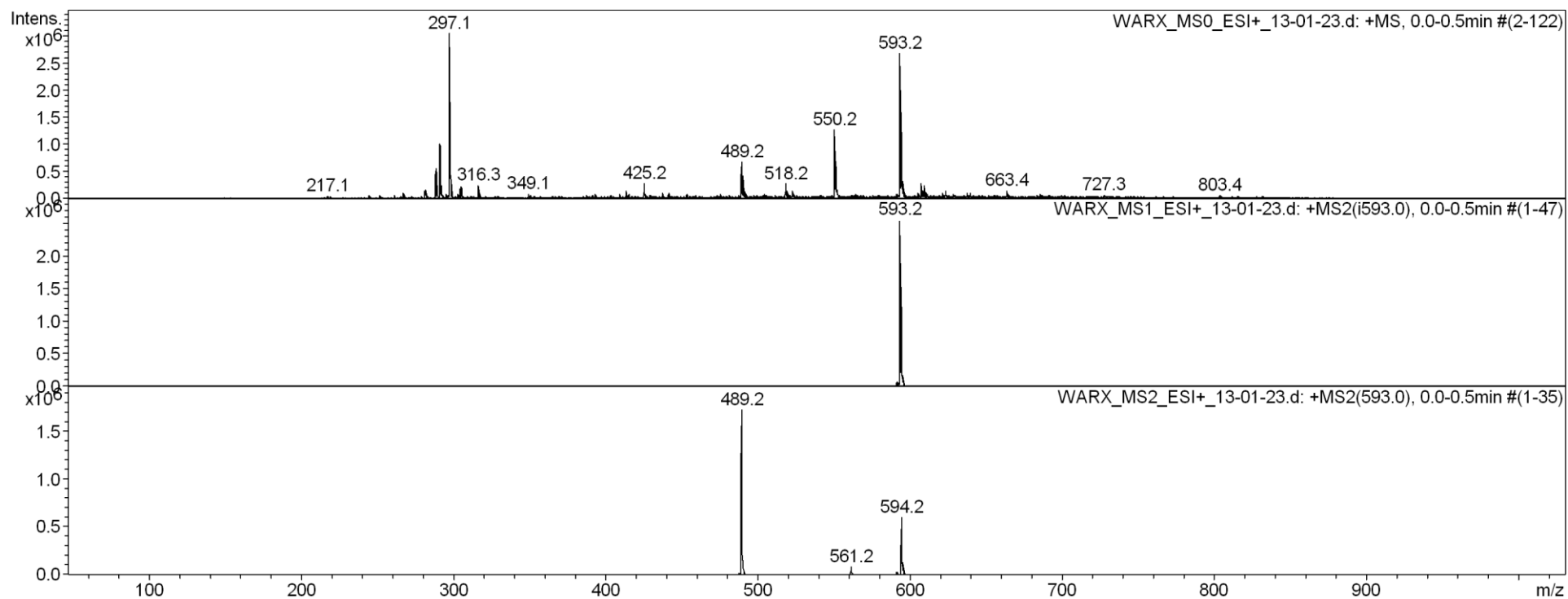
Figura 20 – Espectro de massas de baixa resolução para warifteína

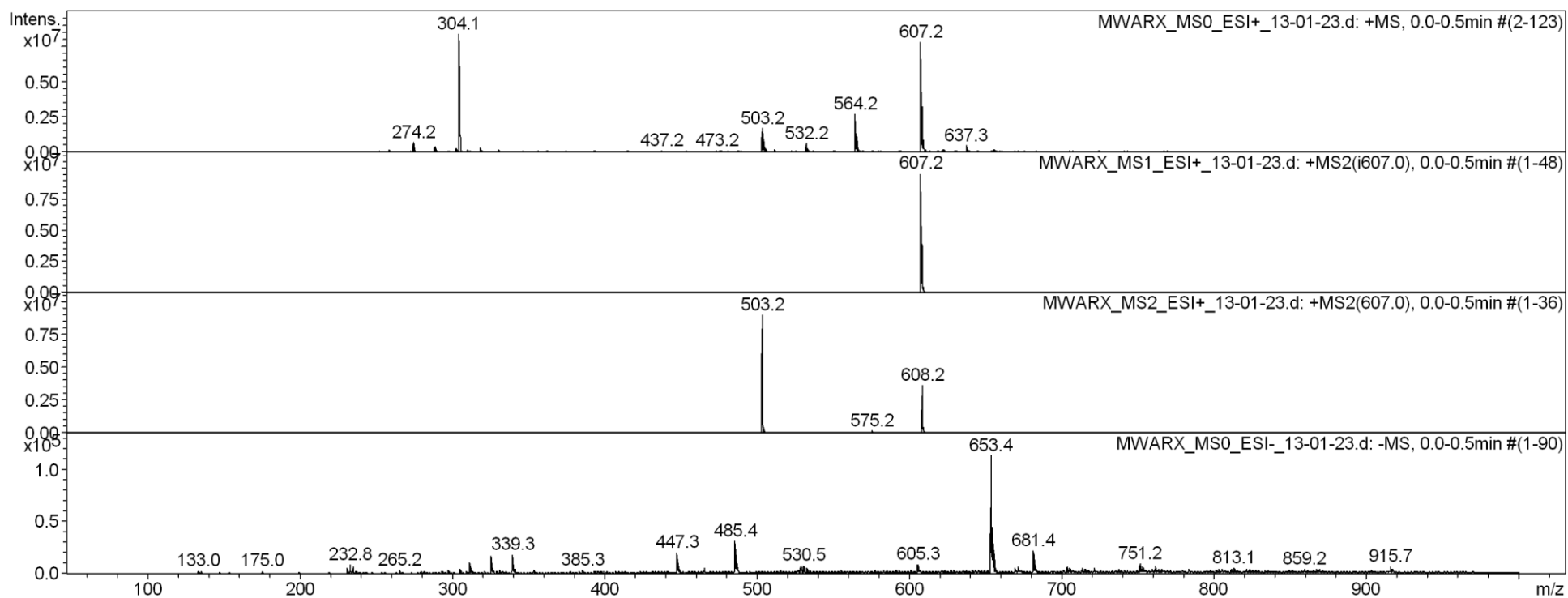
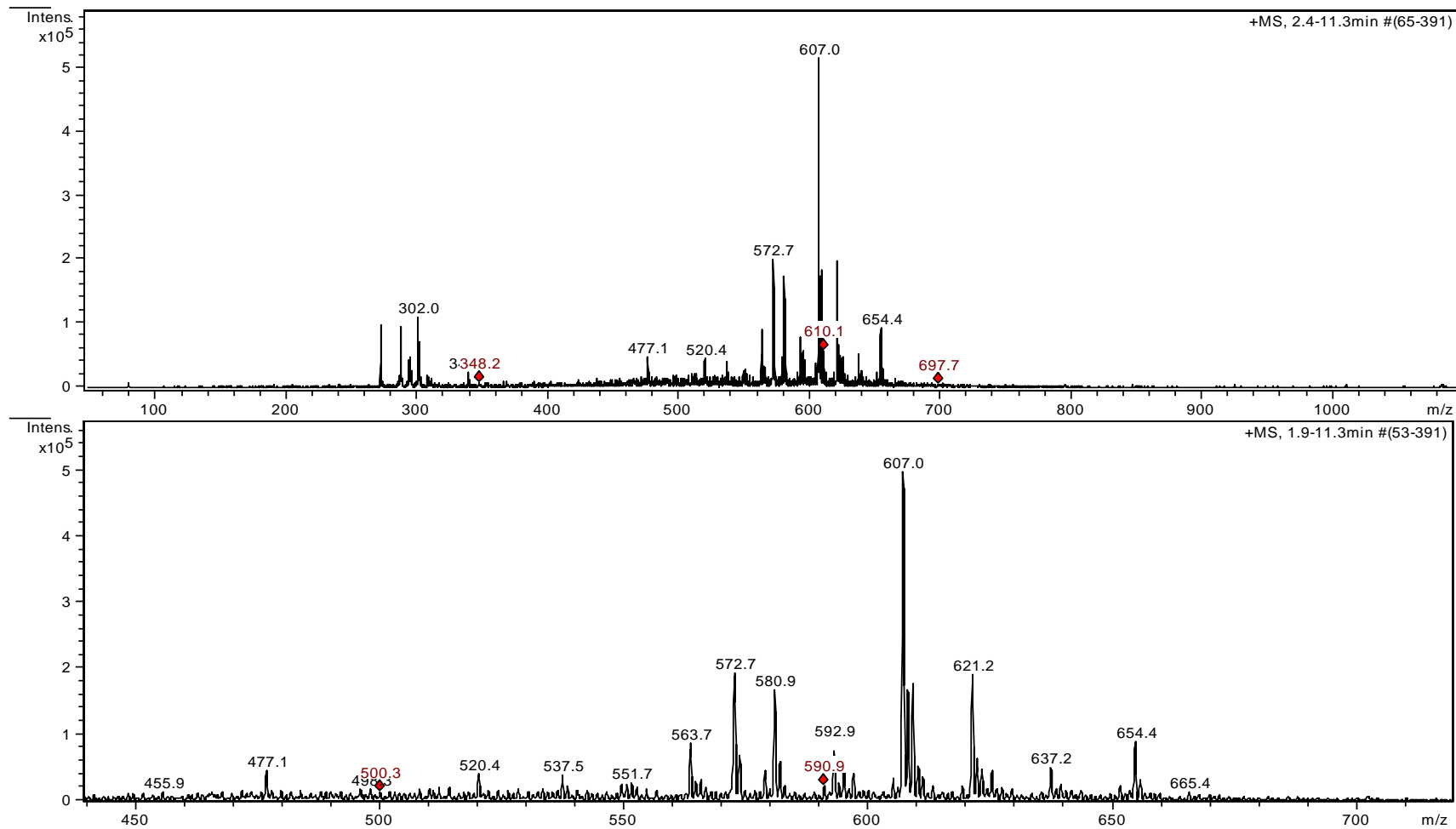
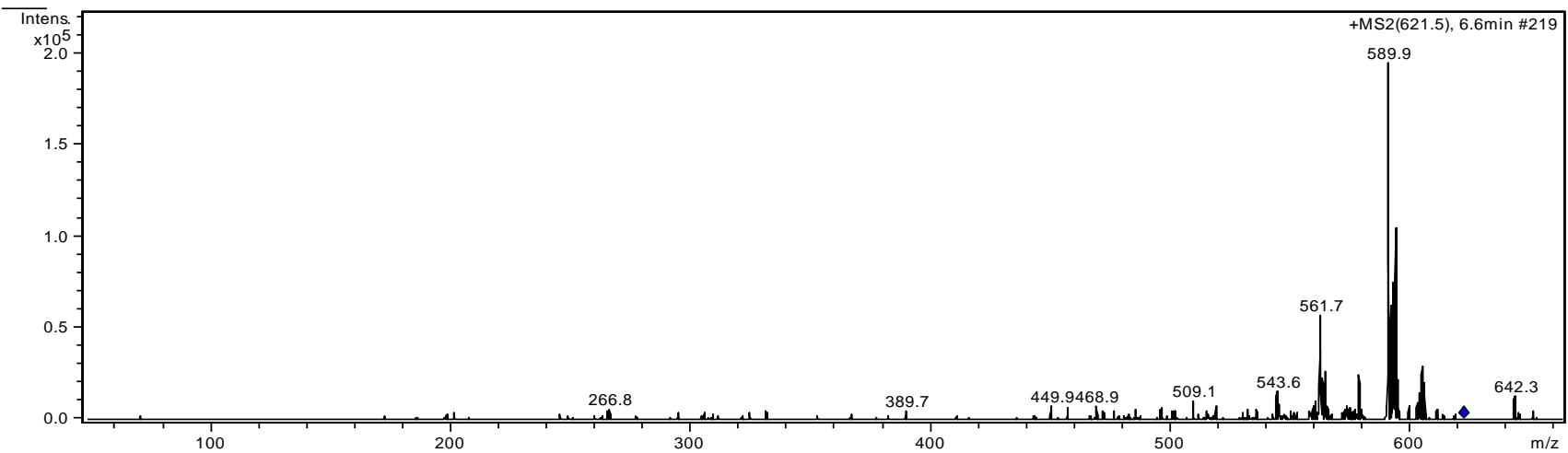
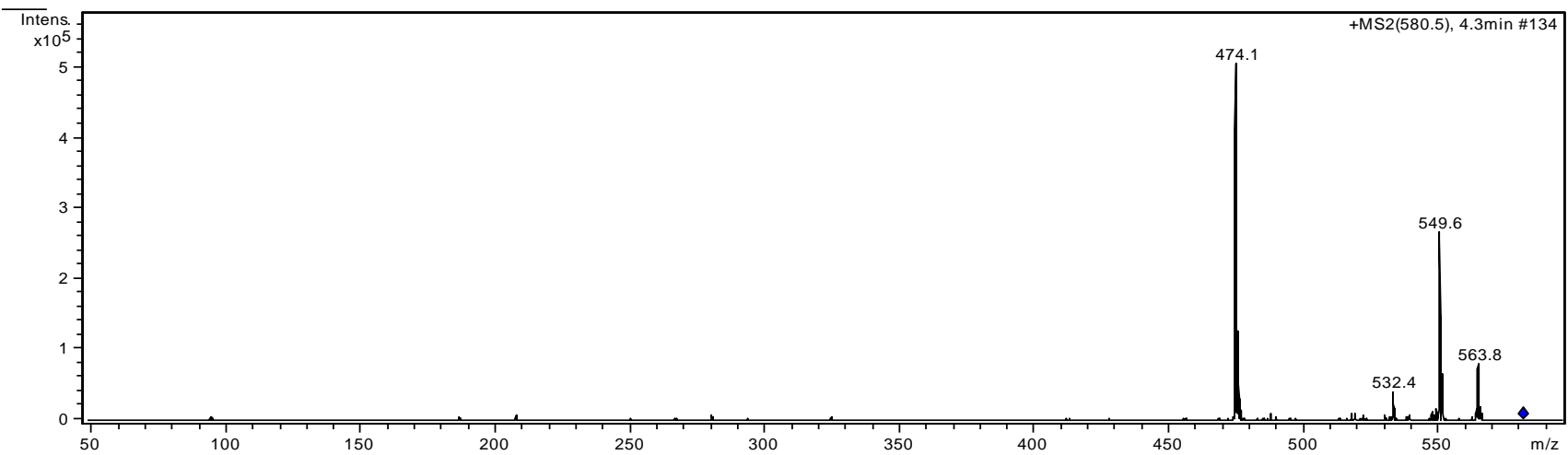
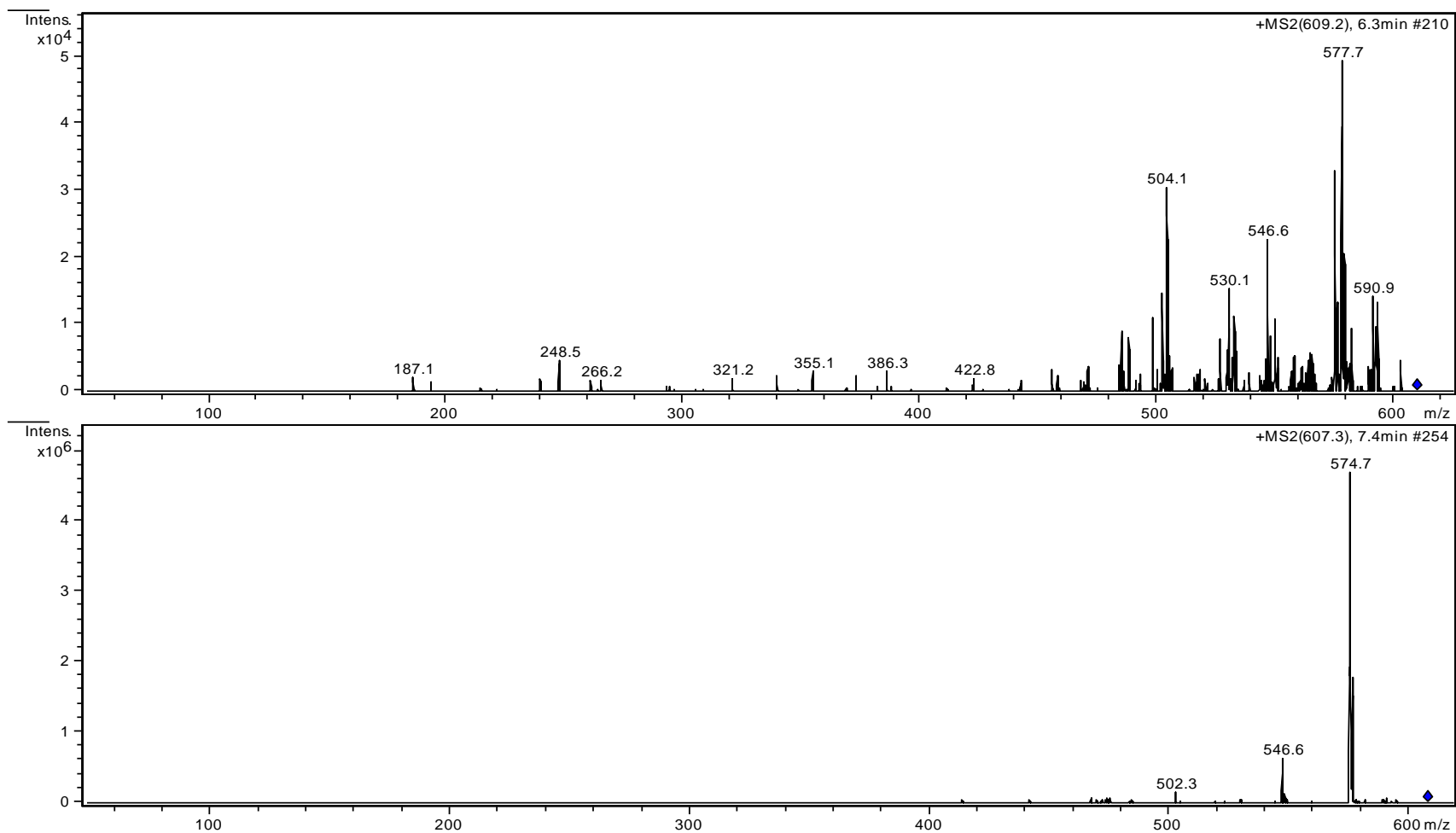
Figura 21 – Espectro de massas de baixa resolução para metil-warifteína

Figura 22 – Espectro de massas de baixa resolução para a mistura Des-7-O-metilroraïmina e Epi-des-7'-O-metilroraïmina







9.3 Elucidação estrutural de CS5

O isolamento de warifteína e metil-warifteína por CLAE-PREP UV/DAD permitiu a obtenção de outras substâncias durante o processo. Dentre as quais CS5 e CS9, a primeira teve sua estrutura elucidada (como discutido adiante), e a segunda encontra-se em processo de elucidação estrutural.

A determinação estrutural da substância CS5 foi realizada através da comparação dos seus valores de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio com os valores constantes na literatura para os alcaloides roraimina (DE LIRA, 2002), desmetilroraimina (MARINHO, 2011) e warifteína (CORTES, 1995) e pela análise dos dados de ressonância magnética nuclear uni e bi-dimensionais. O espectro de massas por eletrospray em modo positivo revelou um pico $M-H^+$ com razão $m/z = 605$. O alfa D foi -30 . Por comparação com os deslocamentos químicos para a roraimina, os singletos em δ_H 6,37 ppm e 6,51 ppm foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos nas posições 5 e 5' respectivamente. Através do espectro de correlação heteronuclear de HSQC é possível observar a correlação entre o sinal de hidrogênio em 6,37 ppm e o sinal de carbono em 103,25 ppm, atribuindo assim este sinal de carbono ao carbono 5. Já o sinal de hidrogênio em 6,51 ppm (H-5'), mostrou uma correlação no espectro de HSQC com o sinal em 108,09 ppm, atribuído assim a C-5'. O espectro de correlação heteronuclear HMBC mostrou uma correlação entre o sinal de hidrogênio em 6,51 ppm (H-5') e um sinal em 147,02 ppm, que foi atribuído ao carbono C-6' (J^2). Além desta correlação, o sinal de hidrogênio em 6,51 ppm (H-5') também mostrou no espectro de HMBC, uma correlação com o sinal em 125,19 ppm, atribuído ao C-4'b, e uma correlação com o sinal em 138,17 ppm, atribuído ao carbono C-7', que juntamente com a ausência do sinal em 61,9 ppm (que na estrutura da roraimina é atribuído à metoxila na posição 7'), permitiu atribuir a hidroxila à posição 7', como no caso da desmetilroraimina. Com uma estratégia semelhante, podem-se realizar as atribuições correspondentes no anel B. Assim, no espectro de HMBC foi possível observar a correlação entre o sinal de hidrogênio em 6,37 ppm (H-5) e o carbono em 108,44, atribuído a C-4b, também com o carbono em 156,09, atribuído a C-6, e finalmente com o carbono em 131,81, atribuído a C-7. Uma correlação importante foi também aquela observada no espectro de HMBC entre C-5 (103,25 ppm) e o multipletto em 2,64 ppm, que foi atribuído aos hidrogênios na posição 4 do anel isoquinolínico. Este sinal em 2,64 ppm pode ser utilizado para definir a atribuição de C-4, através da correlação direta observada no

espectro de HSQC entre ele e o sinal em 25,73 ppm, atribuído assim a C-4. De forma análoga, a correlação heteronuclear no espectro de HMBC observada entre o sinal em 108,09 ppm e o multipletto em 2,48 ppm, permitiu assinalar este multipletto aos hidrogênios metilênicos na posição 4'. Novamente, a correlação direta observada entre o sinal em 2,48 ppm e o sinal em 24,07 ppm no espectro de HSQC, permitiu atribuir este sinal a C-4'. Continuando com o assinalamento do núcleo isoquinolínico, é possível observar no espectro de HMBC, correlação dos hidrogênios metilênicos em H-4 (multipletto em 2,64 ppm) e o sinal de carbono em 46,39 ppm, que foi atribuído ao carbono ligado a nitrogênio na posição 3. De forma análoga, a correlação observada no espectro de HMBC entre o sinal dos hidrogênios em H-4' (multipletto em 2,48 ppm) e o sinal de carbono em 44,09 ppm, permite atribuir este sinal ao C-3'. As correlações diretas no espectro de HSQC entre o sinal deste carbono (C-3') com os multiplettos em 2,79 e 3,22 ppm permitiu atribuir estes multiplettos aos hidrogênios metilênicos em H-3'. Finalizando as atribuições para os núcleos isoquinolínicos, a correlação a 3 ligações no espectro de HMBC entre o sinal em 44,09 ppm e o sinal em 3,88 ppm (dd, $J = 5\text{Hz}$, $J = 3\text{Hz}$), permite atribuir este duplo dubletto ao hidrogênio metínico em C-1'. Por fim, a correlação direta (HSQC) do sinal em 3,88 ppm (H-1') com o carbono em 57,01 ppm permite atribuir este sinal a C-1'. Com relação aos sinais dos anéis aromáticos para-substituídos "D" e "C", há um sinal na região aromática no espectro de hidrogênio em 6,96 ppm, com integral para 4 hidrogênios, e um par de dubletos centrados em 6,74 ppm com integral também para 4 hidrogênios. A atribuição destes sinais foi realizada com a ajuda dos dados de correlação heteronuclear. Assim, o singletto largo em 6,96 ppm foi atribuído aos hidrogênios do anel "C", H-10'/H-14' e H11'/H-13', enquanto que o dubletto em 6,69 ppm ($J = 9\text{Hz}$) foi atribuído aos hidrogênios H-11 e H-13 do anel "D" e o outro dubletto em 6,74 ppm ($J = 9\text{Hz}$) aos hidrogênios H-10 e H-14, também do anel "D". Os dados de correlação heteronuclear no espectro de HSQC confirmam estas atribuições ao revelarem as correlações diretas entre o singletto largo em 6,96 ppm e os carbonos em 129,03 e 127,55 ppm atribuídos respectivamente aos pares C-11'/C-13' e C-10'/C-14'. De forma análoga, é possível observar as correlações entre o dubletto em 6,69 ppm (H-11 e H-13) e o carbono em 115,06 ppm e entre o dubletto em 6,74 ppm (H-10 e H-14) e o carbono em 127,55 ppm, o que confirma a atribuição do sinal em 115,06 ppm a C-11/C-13 e o sinal em 127,55 a C-10/C14. As correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC entre H-10/H14 (d, 6,74 ppm) e o carbono em 155,04 ppm, permitiu atribuir este sinal ao C-12. De

forma análoga, a correlação entre H-11/H-13 (d, 6,69 ppm) e o sinal em 130,47 ppm, permitiu atribuir este sinal ao C-9. As correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC entre H-10'/H-14' (6,96 ppm) e o sinal de carbono metilênico em 38,88 ppm permitiu atribuir este sinal ao carbono C-15', que une o anel "B" ao "C". Já as correlações entre os sinais de H-11'/H-13' (6,96 ppm) e o sinal do carbono metilênico em 74,41 ppm permitiu atribuir este sinal ao C-16', que faz a ligação entre o anel "C" ao anel "F". De maneira análoga, a correlação entre o sinal em 6,74 ppm (H-14/H-10) e o carbono em 44,34 ppm, permitiu atribuir este sinal ao C-15. A característica marcante do espectro deste alcaloide, e que o distingue da warifteína, da roraimina e da desmetil-roraimina, é a ausência do sinal da carbonila na posição 15 presente na roraimina e desmetil-roraimina e ao mesmo tempo a existência de um carbono metilênico diretamente ligado a um átomo de oxigênio correspondente ao sinal em 71,33 ppm. Além disso, a presença de um dubleto largo em 4,45 ppm no espectro de hidrogênio, reforça a presença de um grupo metilênico ligado diretamente a oxigênio. Este sinal em 71,33 ppm foi atribuído a um carbono (C-8¹) concebido como fazendo parte de um anel pirânico, e diretamente ligado ao C-15. Esta proposta foi corroborada pelas correlações heteronucleares entre o dubleto largo em 4,45 ppm (H-8¹) e C-15 (44,34 ppm), entre o dubleto em 4,45 ppm e C-9 (130,47 ppm), entre o dubleto em 4,45 ppm e C-8 (149,76 ppm) e finalmente entre o dubleto em 4,45 ppm e C-1 (161,24 ppm). Assim, a estrutura do alcaloide proposto é aquela mostrada na Figura 17. Trata-se de um alcaloide inédito (C₃₇H₃₆N₂O₆, peso molecular = 604,69), que representa mais uma variação estrutural em torno do carbono na posição 15. O alcaloide foi nomeado de Sousa.

Figura 17 – Estrutura proposta para o alcaloide inédito CS5 – Sousa

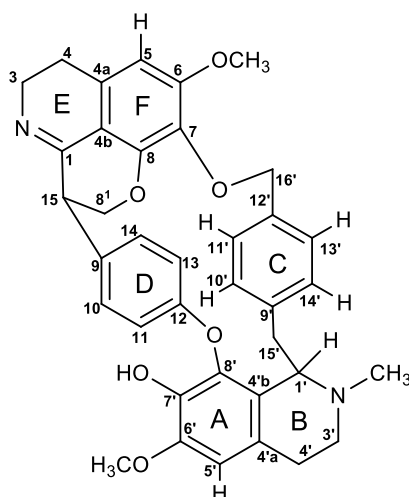


Tabela 7 Dados espectroscópicos de deslocamentos químicos de RMN para ^{13}C e ^1H (CDCl_3 , 75 e 300 MHz, δ em ppm) para o alcaloide Sousina isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

	C	H	HMBC
1	161,24		H-8 ¹ , H-15, 2H-3
6	156,09		H-5, OCH ₃ -6
12	155,04		H-11,13,10,14
8	149,76		8 ¹
6'	147,02		H-5', OCH ₃ -6'
9'	140,78		H-11',13',10',14'; 2H-15'
7'	138,17		H-5'
8'	138,17		-
12'	133,78		H-11',13',10',14'; 2H-16'
4a	132,52		H-5, 2H-4
7	131,81		2H-16'
9	130,47		H-11,13,10,14; H-15, 2H-8 ¹
4'b	125,19		H-5', 2H-15'
4'a	124,61		H-3'
4b	108,44		H-5, H-15, H-4
CH			
11',13'	129,03	6,96 (sl)	2H-16'
10,14	127,55	6,74 (d, 9,0 Hz)	H-15, H-11, 13
10',14'	127,55	6,96 (sl)	2H-15', H-11',13'
11,13	115,06	6,69 (d, 9,0 Hz)	H-10, 14
5'	108,09	6,51 (s)	2H-4'
5	103,25	5,33 (s)	2H-4
1'	57,01	3,81 (dl)	2H-3'
15	44,34	3,59 (sl)	8 ¹ , H-10,14
CH₂			
16'	74,41	5,06 (d, 11) 4,99 (d, 11)	H-11', 13'
8¹	71,33	4,45 (dl, 12)	-
3	46,39	4,26 (dd, 12, 1,2)	2H-4
3'	44,09	3,22 (m); 2,79 (m)	H-1'
15'	38,88	2,93 (m); 2,36 (m)	H-10', 14'
4	25,73	2,64 (m)	H-5, 2H-3
4'	24,07	2,48 (m)	H-5'
CH₃			
OCH₃-6	56,07	3,96 (s)	-
OCH₃-6'	55,95	3,88 (s)	-
N-CH₃	42,45	2,04 (s)	2H-3'

Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 0 a 12 ppm

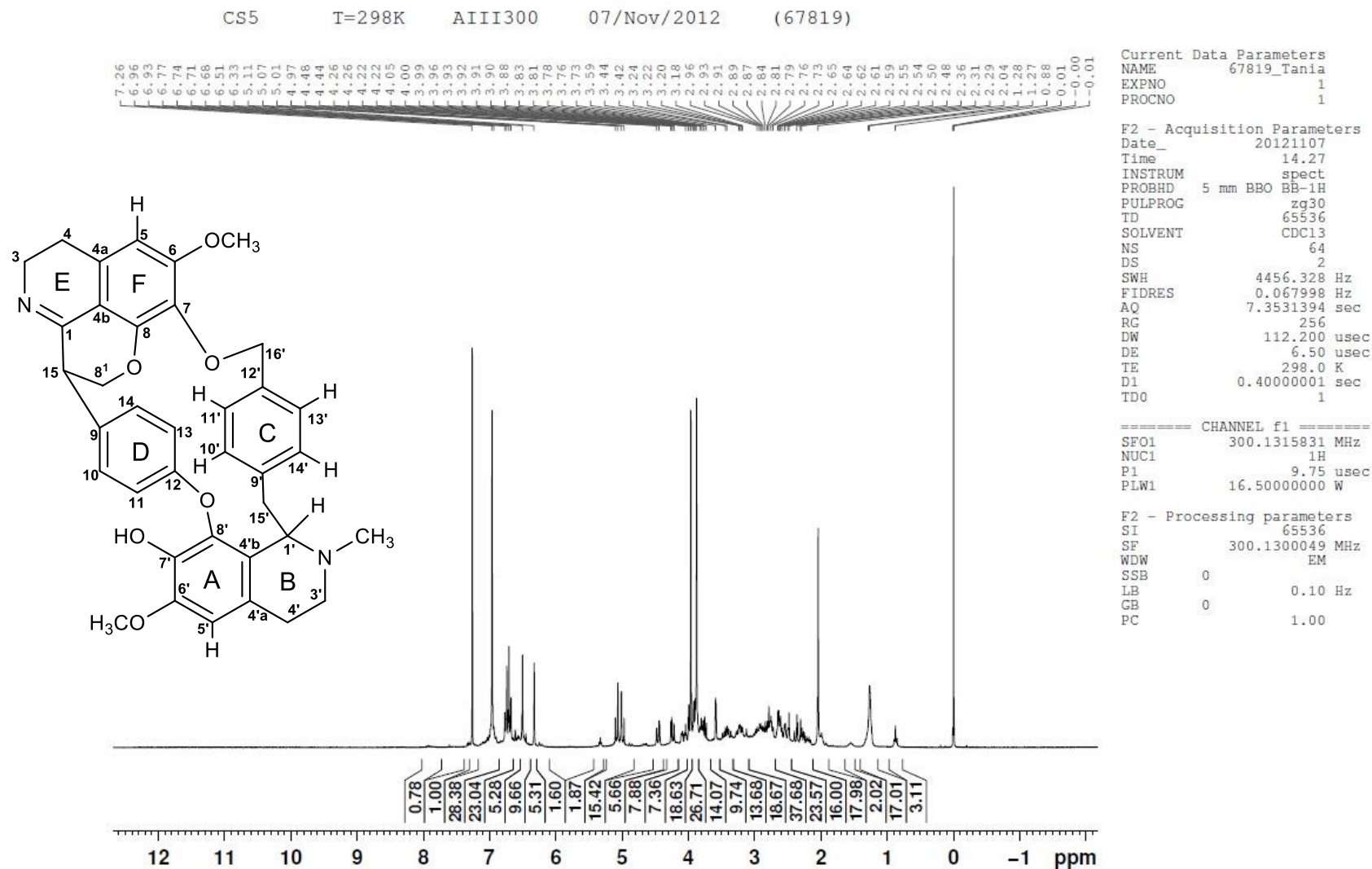


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 6,0 a 9,0 ppm

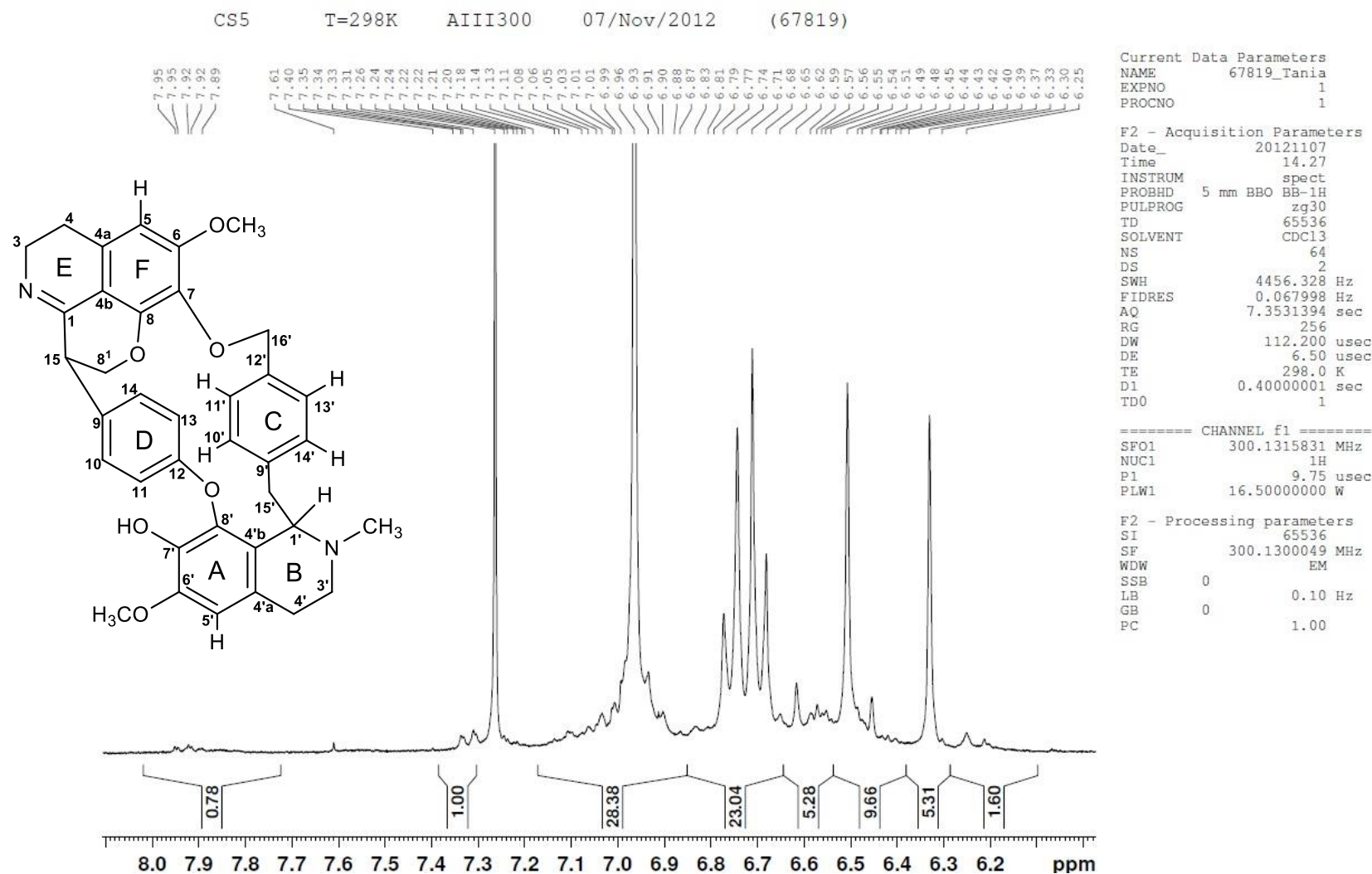


Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 4,0 a 5,0 ppm

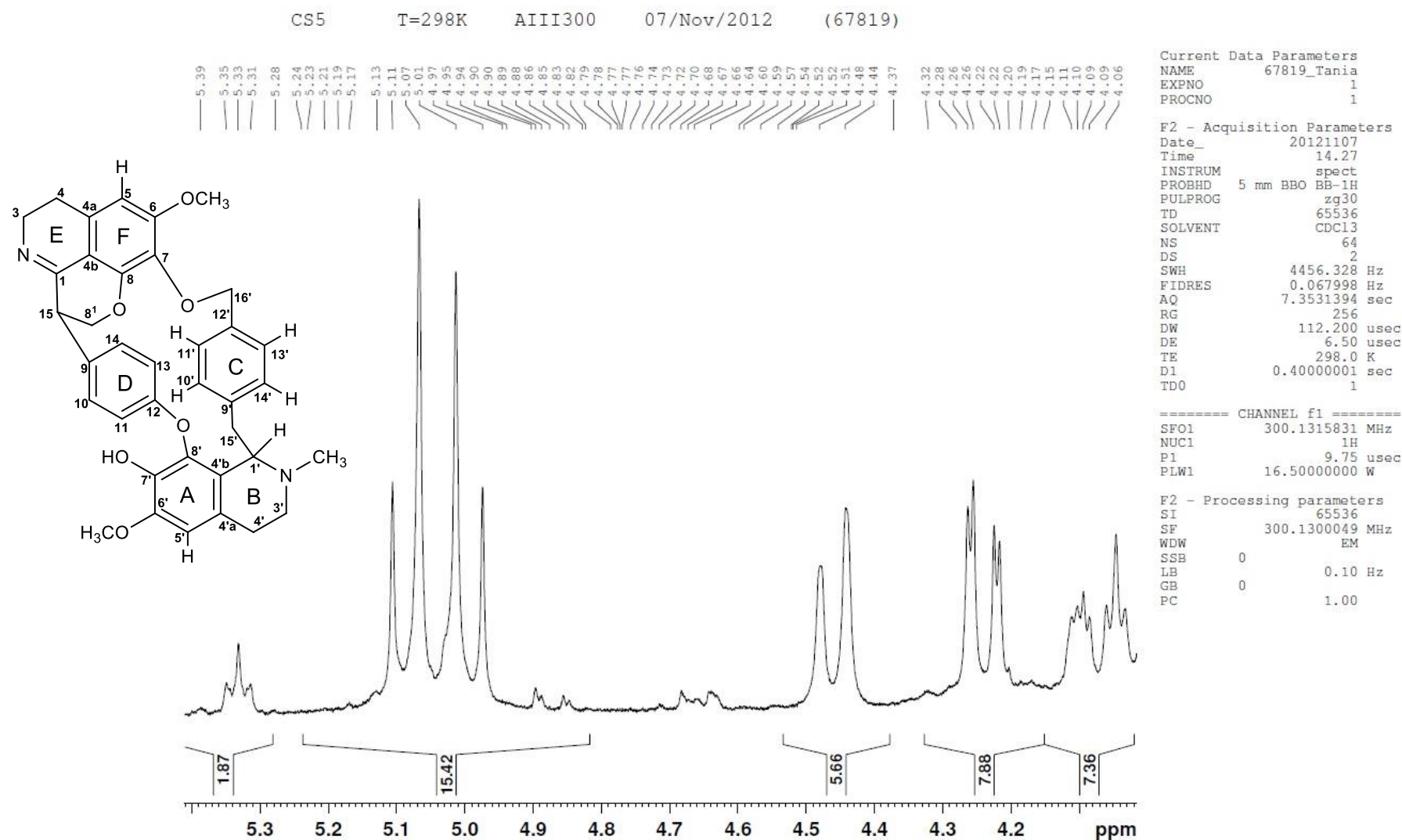


Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 3,0 a 4,0 ppm

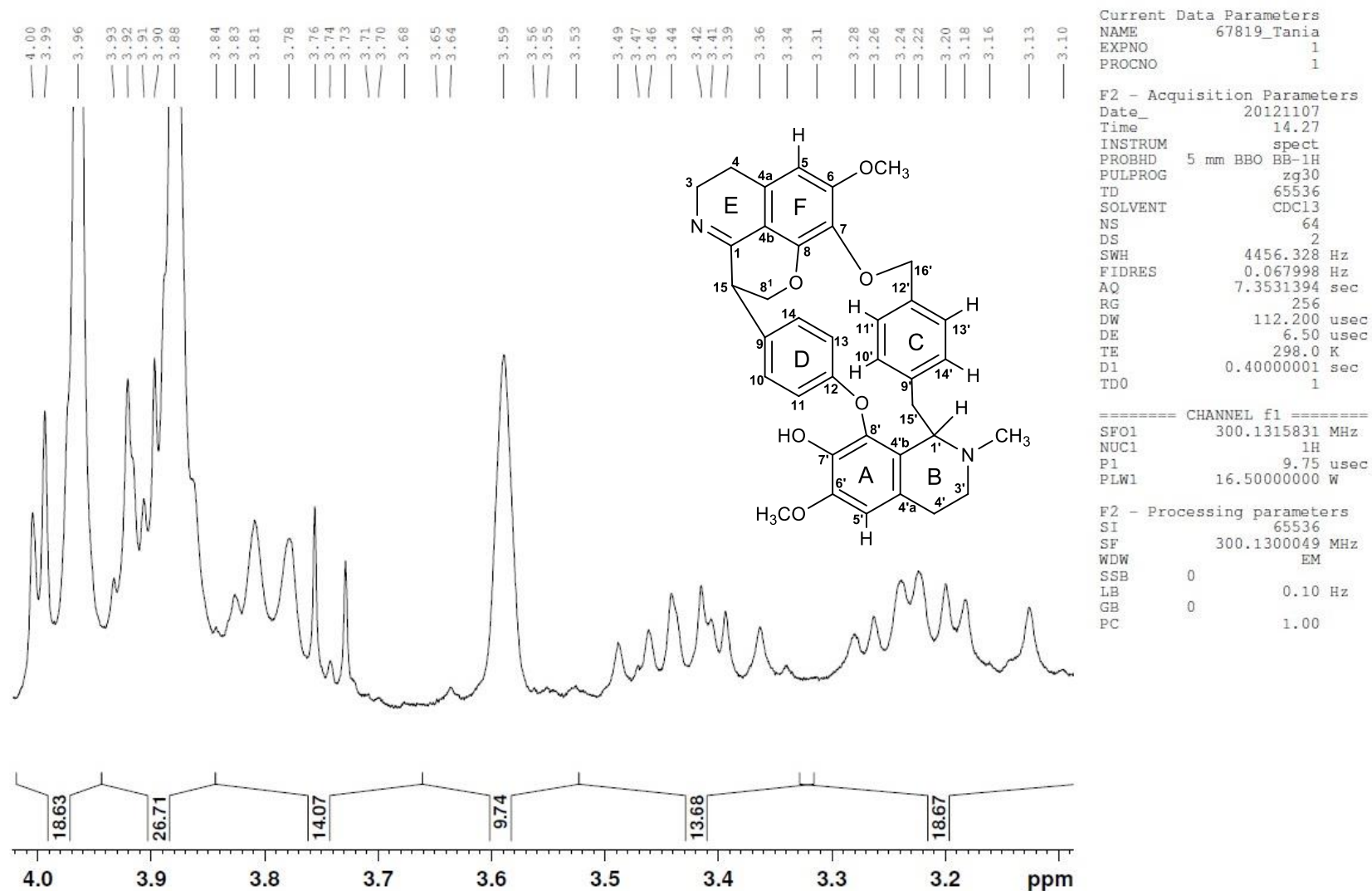


Figura 28 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 2,0 a 3,0 ppm

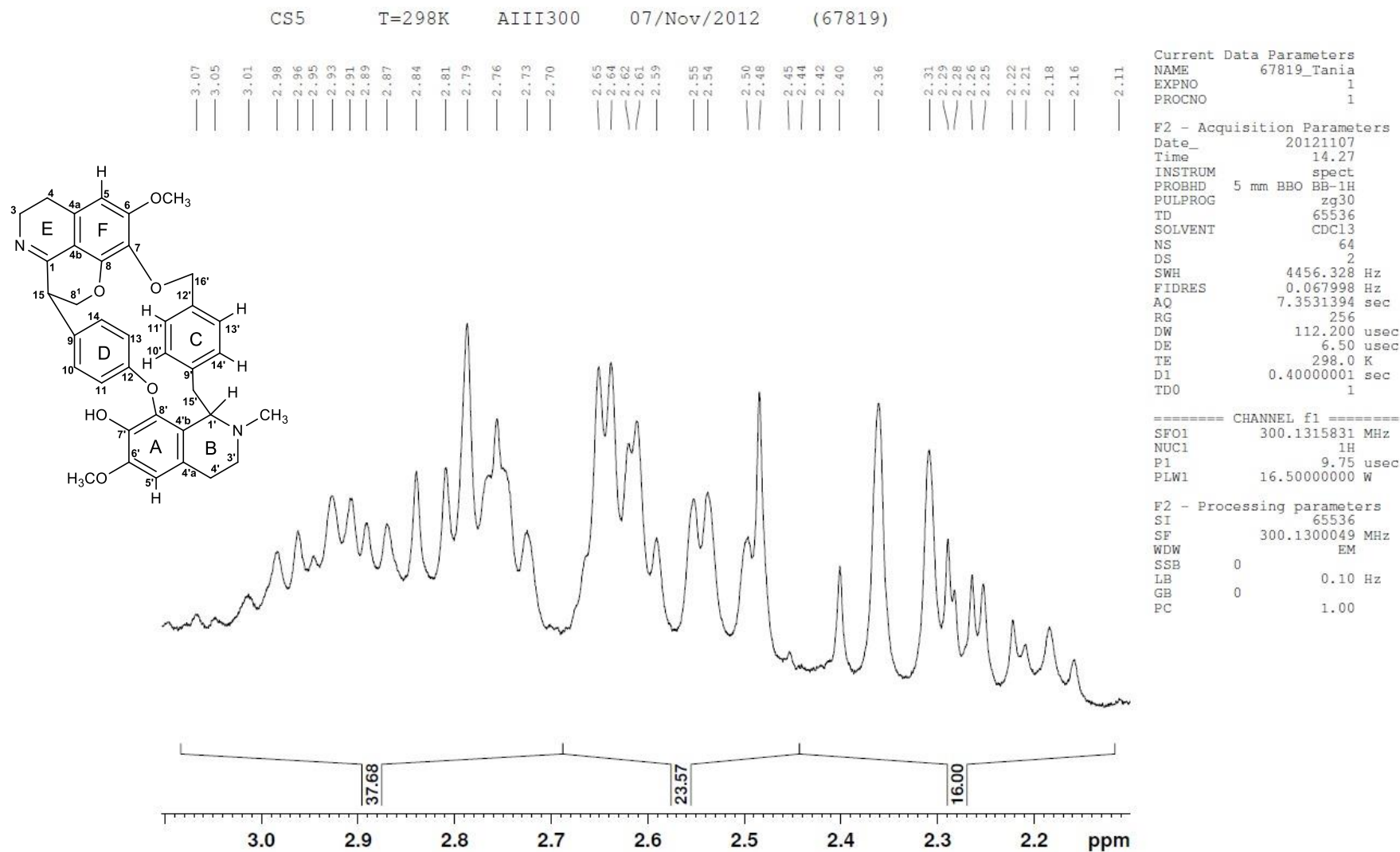


Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H para Sousina (CDCl_3 , 300 MHz) – região 1,0 a 2,0 ppm

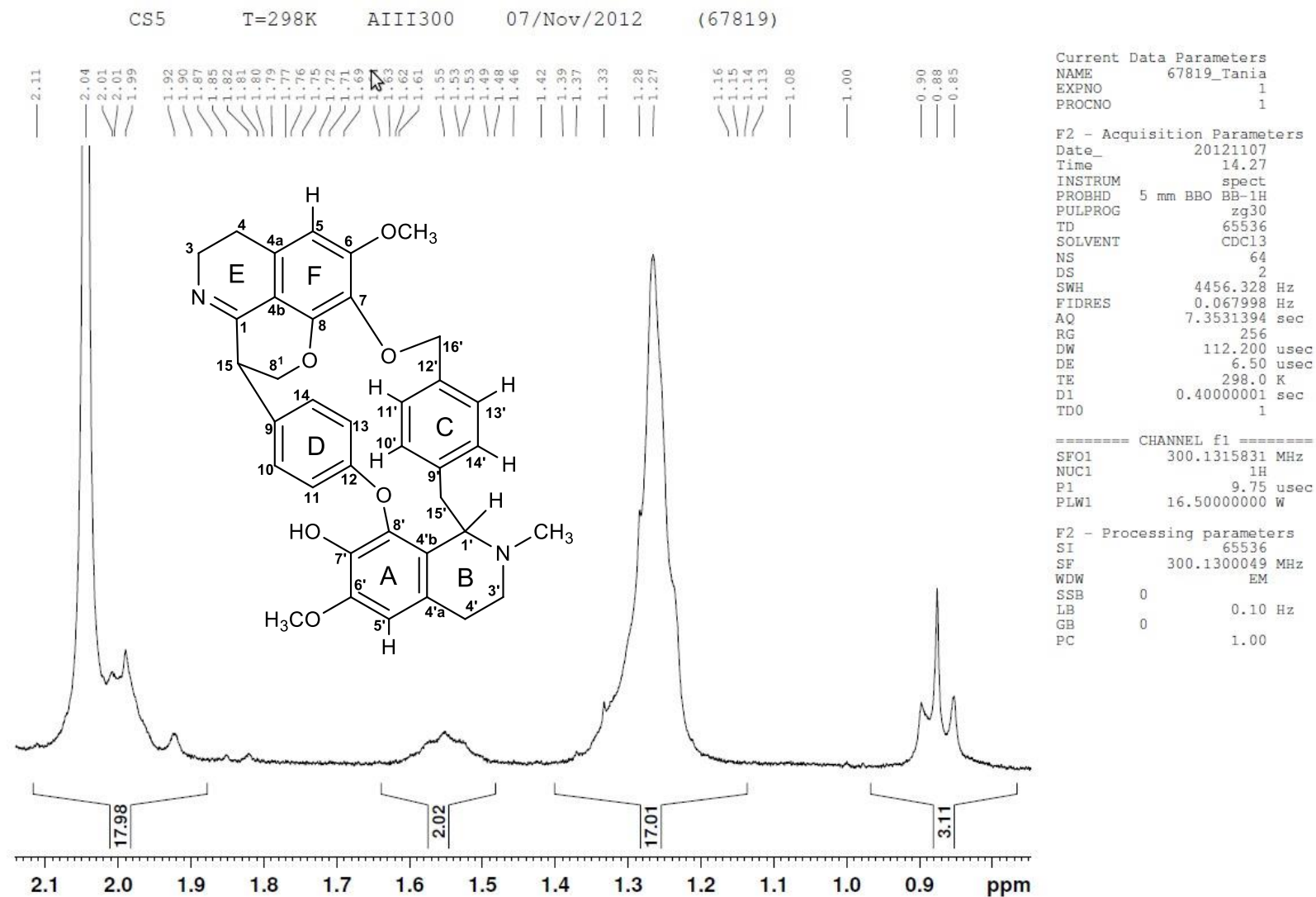


Figura 30– Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 0 a 220 ppm

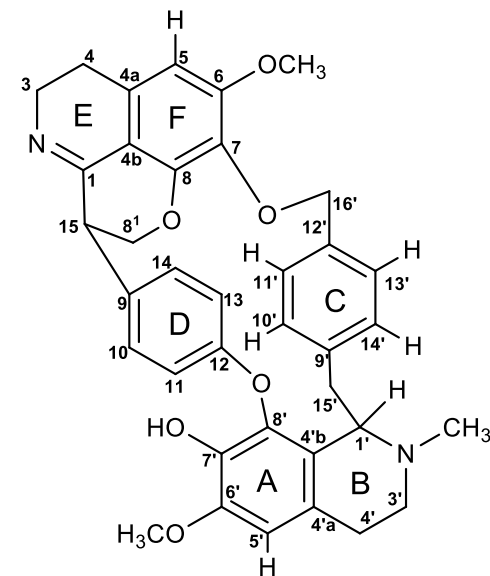
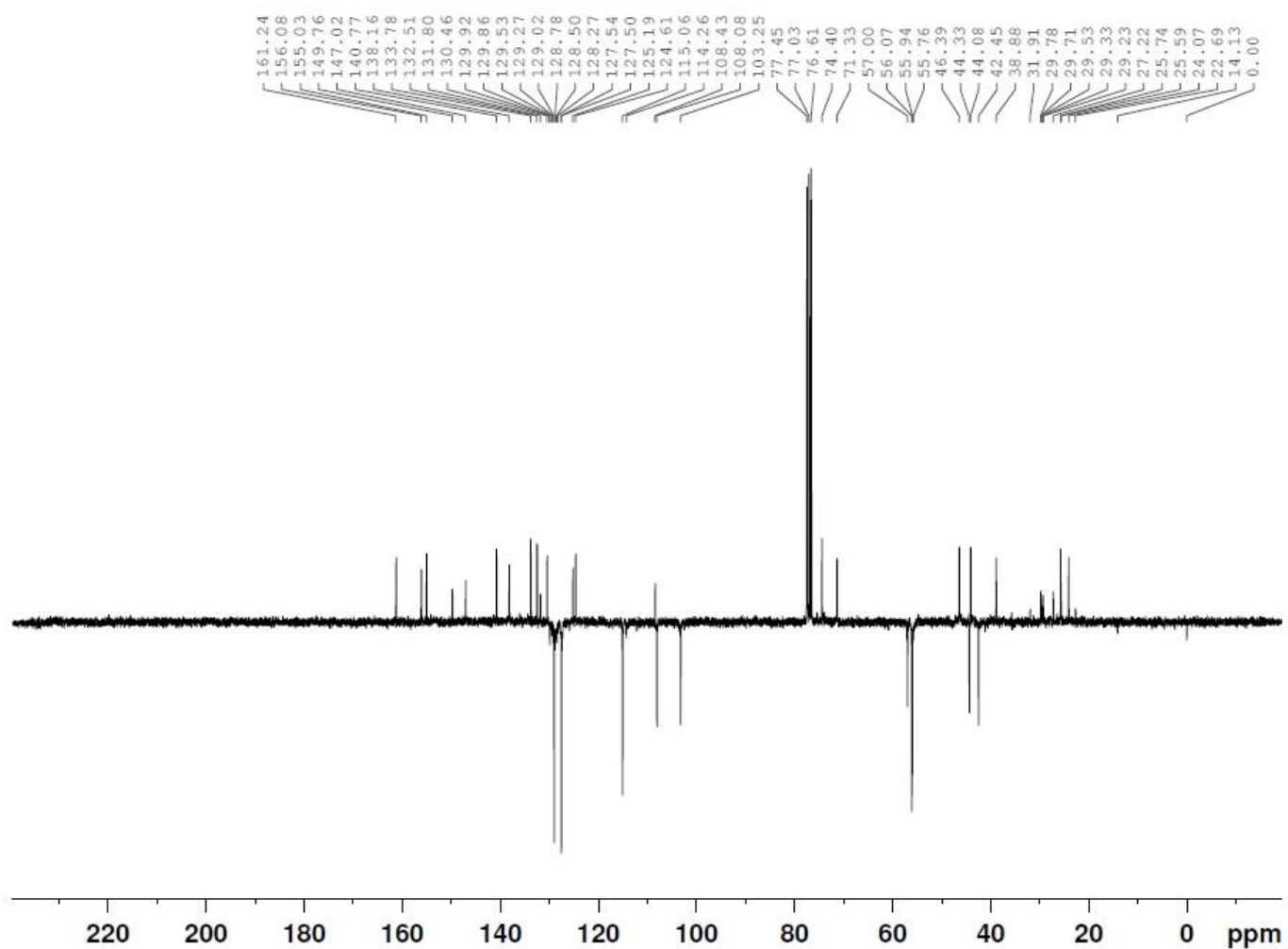


Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 100 a 160 ppm

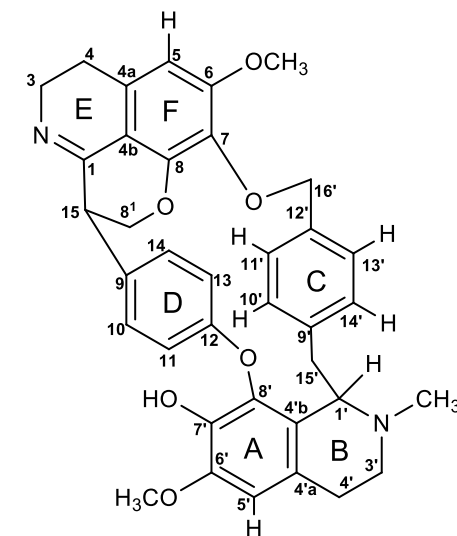
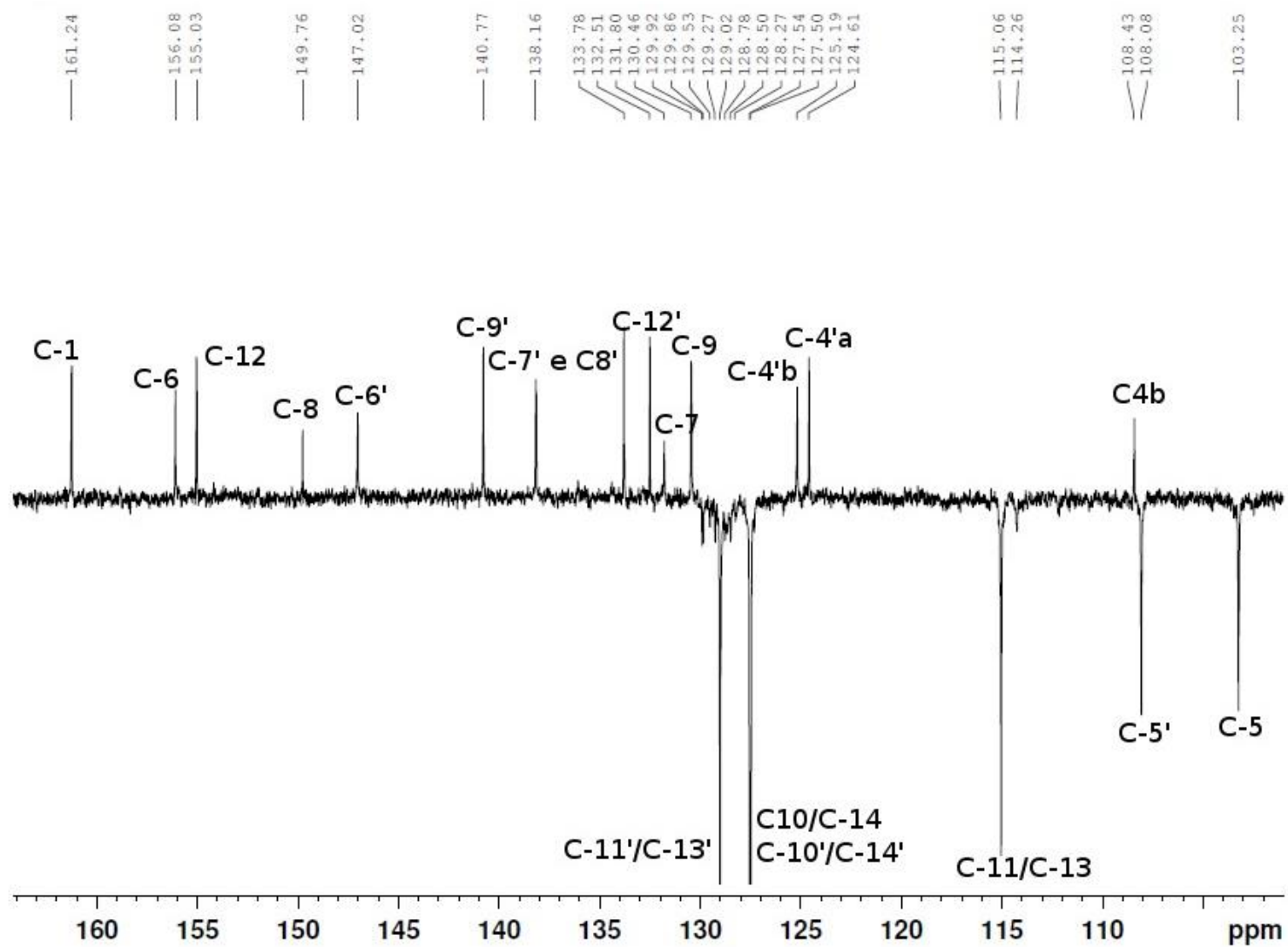


Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT para Sousina (CDCl_3 , 500 MHz) – região 20 a 75 ppm

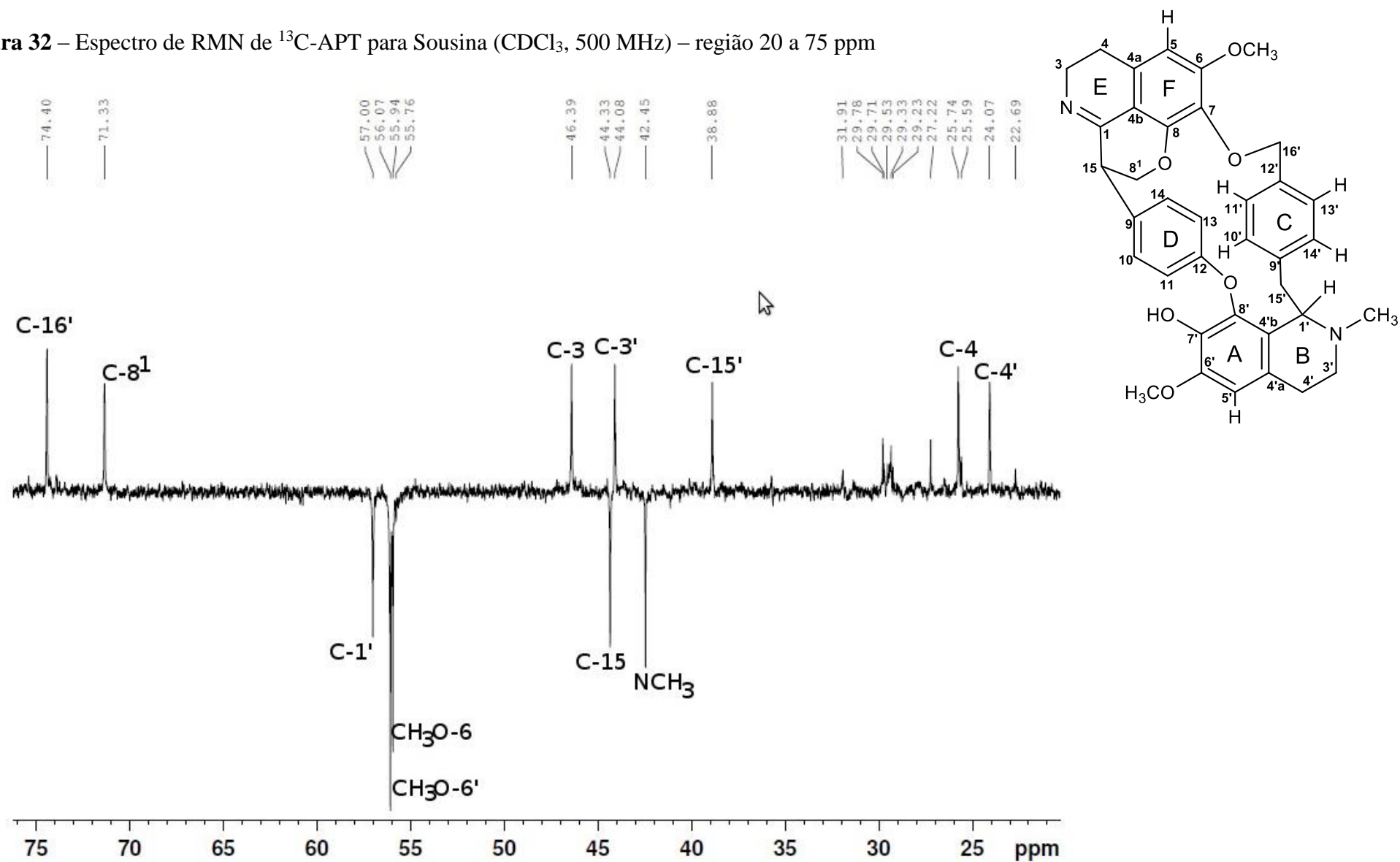


Figura 33 – Espectro de RMN de HSQC para Sousina (CDCl₃, 500 MHz) – região 1,5 a 7,5 ppm

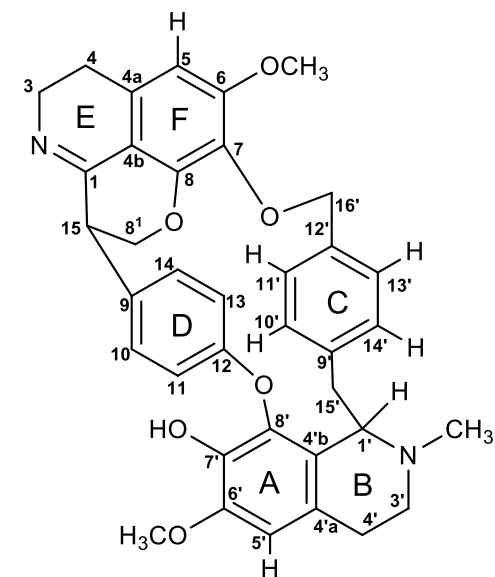
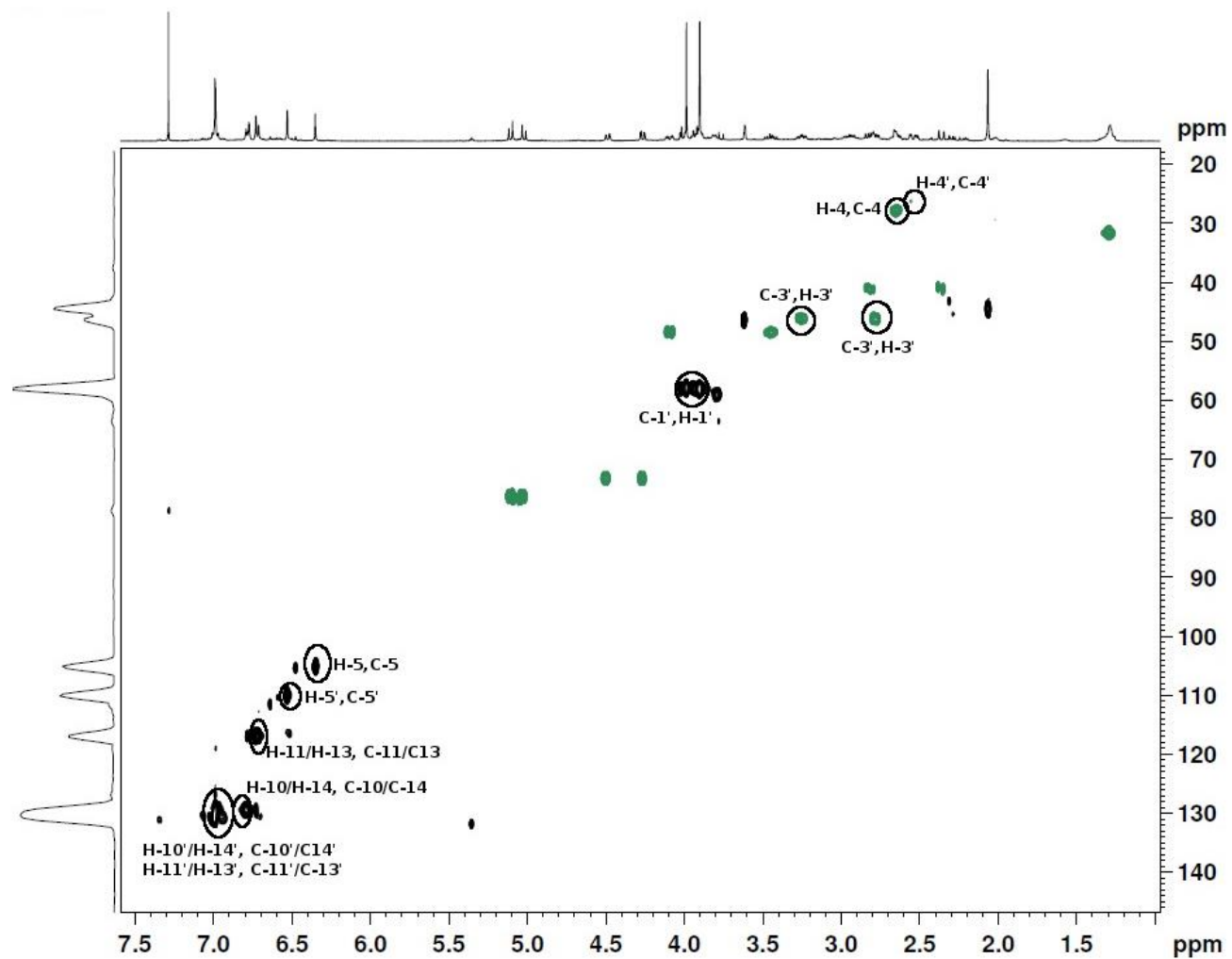


Figura 34 – Espectro de RMN de HSQC para Sousina (CDCl₃, 500 MHz) – região 1,5 a 7,5 ppm

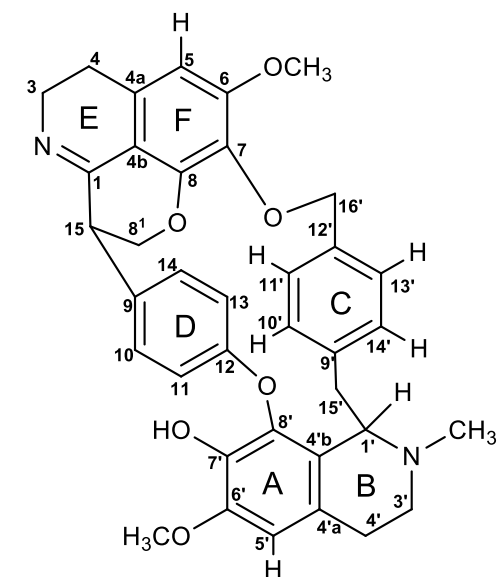
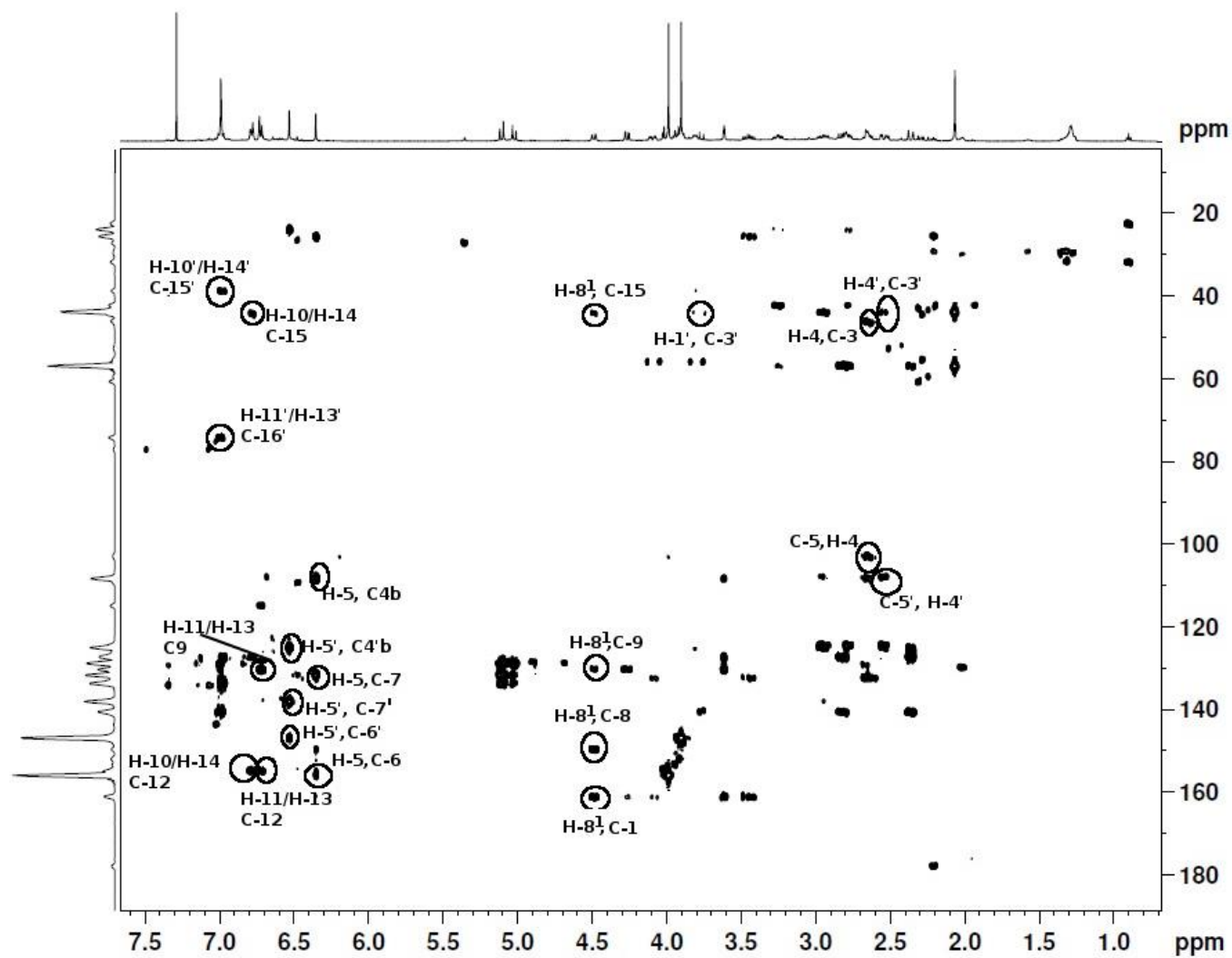
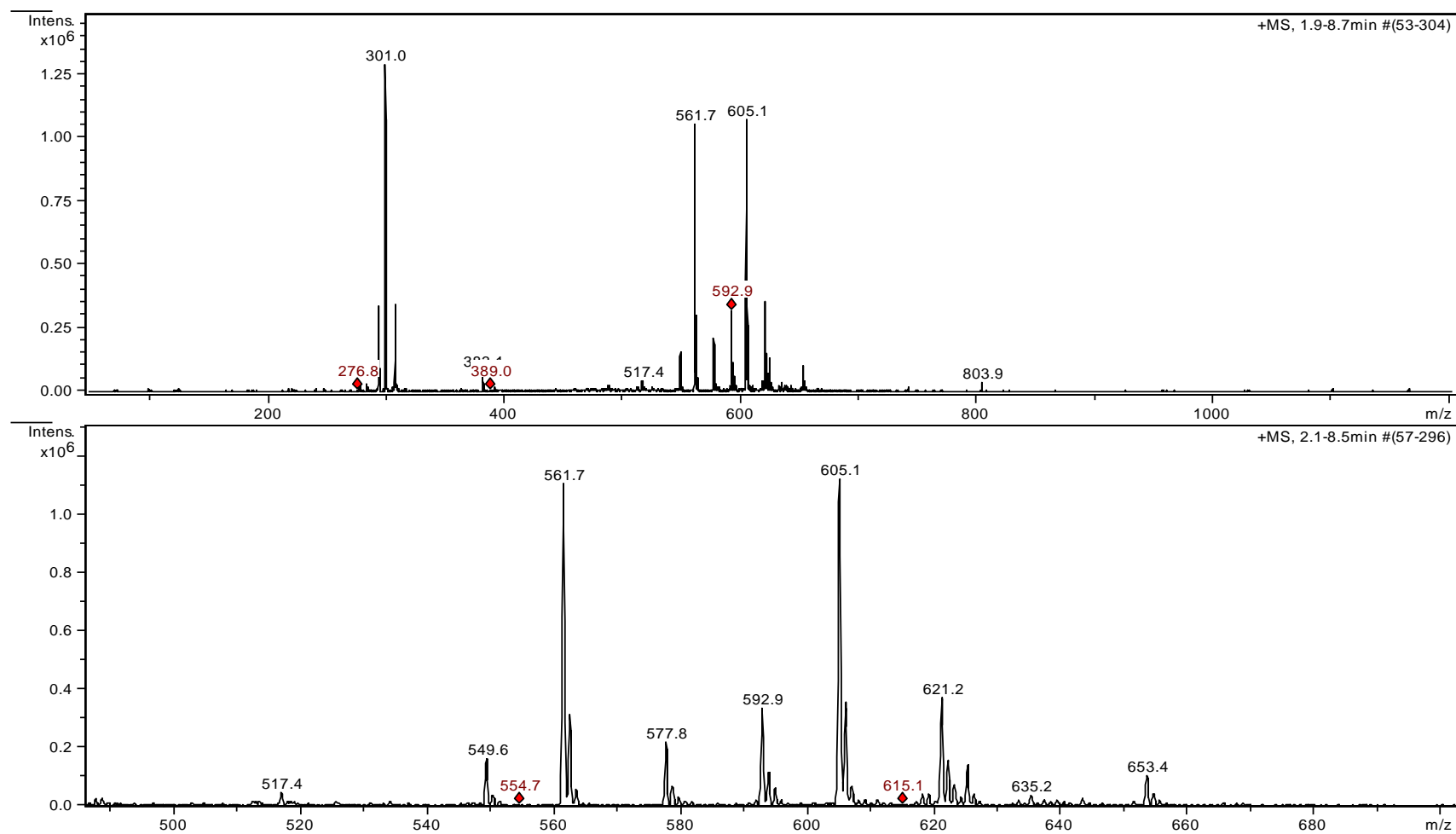
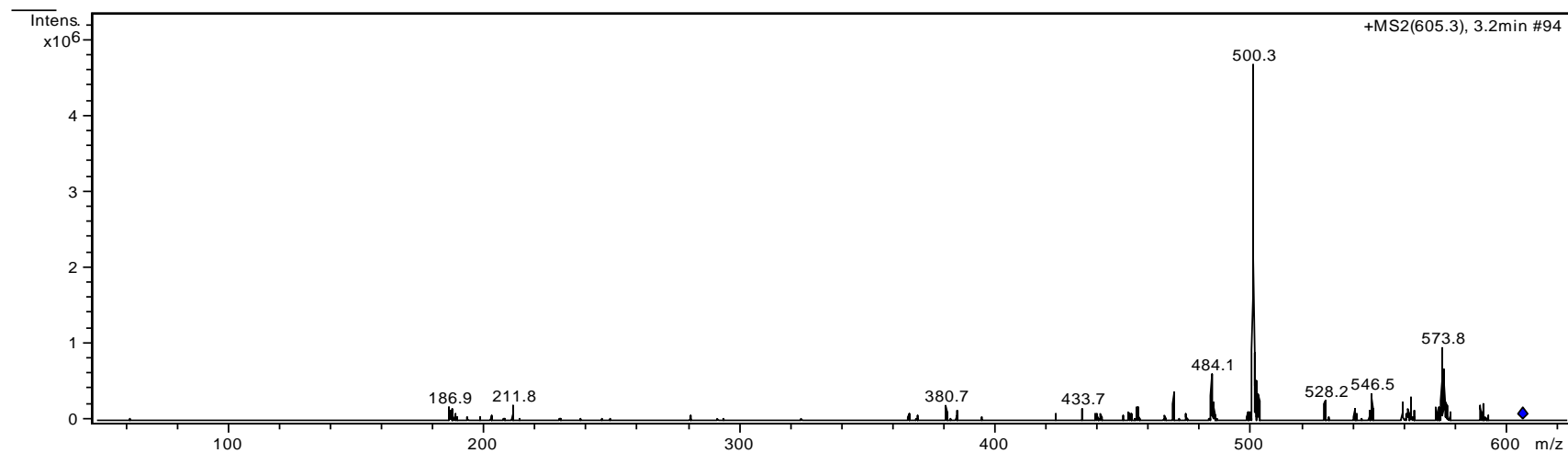
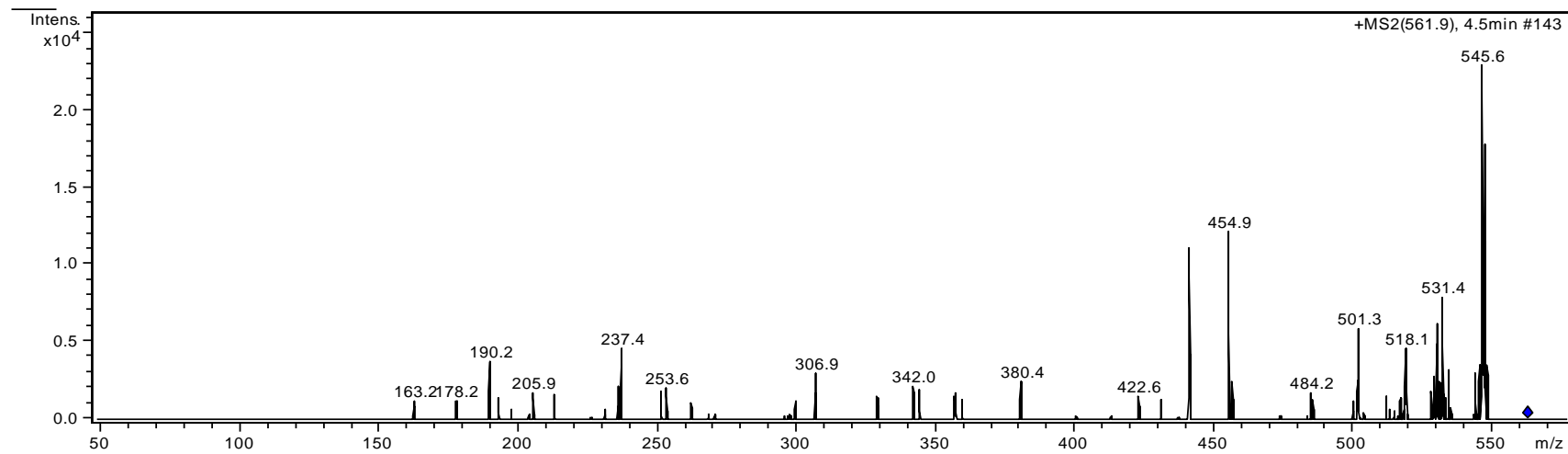
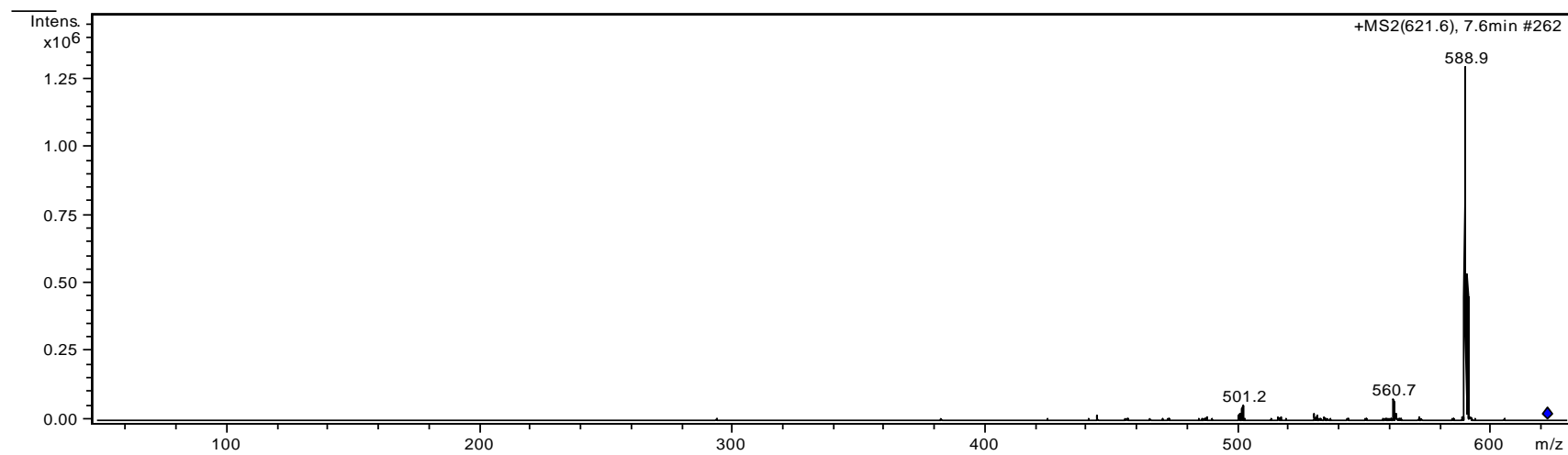


Figura 35 – Espectro de massas para Sousina





Capítulo II

Desenvolvimento do método para quantificação de warifteína em plasma

10 INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de um método para estudo farmacocinético, a quantificação do analito numa matriz biológica é uma importante etapa, sendo de interesse que o mesmo seja simples e de baixo custo, além de apresentar também detecção e seletividade adequadas, juntamente com outros parâmetros de validação exigidos pelas agências reguladoras.

As separações em CLAE têm usado, por muito tempo, detectores do tipo ultravioleta, fluorescência ou detecção eletroquímica. Em CLAE-UV de fase reversa há uma menor retenção de compostos mais polares na coluna cromatográfica, levando à eluição dos mesmos no volume morto da coluna. Isto é observado como picos interferentes da detecção e quantificação de composto de interesse, assim, faz-se necessário o uso de procedimentos de *clean-up* de amostras, visando melhorar sua análise, e requerendo, devido ao grande tempo dispensado em sua preparação, análises cromatográficas rápidas.

A técnica analítica de espectrometria de massas pode ser utilizada para o fornecimento de informações referentes ao peso molecular, e também de características relativas à estrutura de uma amostra, gerando informações necessárias à identificação de compostos desconhecidos, além de permitir quantificar e elucidar misturas complexas. Na área farmacêutica, a técnica tem importante aplicação na elucidação estrutural de novas substâncias, e também em estudos de farmacocinética e de metabolismo de fármacos (KAZAKEVICH, LoBRUTO, 2007).

Na análise de matrizes biológicas, tem-se utilizado amplamente a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com interface de Ionização por Eletrospray/Eletronebulização como escolha para fins de quantificação desses analitos. O uso da técnica acoplada CLAE-EM/EM-ESI deve-se às suas características de elevada seletividade, sensibilidade e rendimento, que a fazem crescente entre os laboratórios clínicos (TAYLOR, 2005).

Por um longo tempo, o acoplamento das técnicas de cromatografia a líquido de alta eficiência e espectrometria de massas era um processo muito delicado, uma vez que a introdução de um líquido no alto vácuo do espectrômetro de massas a um fluxo médio de 1 mL/min e sua subsequente evaporação iria resultar na queda imediata do vácuo. Para

driblar tal incompatibilidade, várias interfaces foram desenvolvidas, mas ainda existem desvantagens.

Foi com a introdução da interface de ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization* - API) que o acoplamento CLAE-EM deu-se com êxito. Nessa interface, o eluente advindo da CLAE é evaporado e ionizado fora do espectrômetro de massas em pressão atmosférica, de forma que somente os íons gerados são introduzidos no espectrômetro de massas, evitando o bombeamento de grande quantidade de gás para o equipamento. O resultado disso foi a possibilidade de uso do espectrômetro de massas como detector em combinação com separação de amostras por CLAE, sendo a interface com a técnica de ionização por eletrospray a mais amplamente utilizada, seguida pela ionização química à pressão atmosférica (ERMER, 2000).

Na ionização por eletrospray o eluente da CLAE é nebulizado no EM através de uma agulha de aço inoxidável pneumática mantida sob um elevado potencial de vários kilovolts resultando num nebulizado de finas gotículas altamente carregadas. É após a dessolvatação dessas gotículas que se formam as partículas carregadas do analito, porém, essa secagem não acarreta nenhum estresse térmico para a amostra. Assim, moléculas grandes como peptídeos e proteínas podem ser multiplamente carregadas (FINEHOUT, 2004).

O detector de massas pode ser configurado para o isolamento de íons específicos, o que pode reduzir o tempo de limpeza e de separação cromatográfica da amostra comparando-se com outros métodos de detecção menos seletivos. Ainda, interferentes que são aparentes na detecção UV não são observados no espectrômetro de massas quando massas específicas são monitoradas (Thomas M. Annesley Ion suppression in Mass Spectrometry Clinical Chemistry 49:7 1041–1044 (2003).

11 TÉCNICAS HIFENADAS

A referência ao termo técnicas hifenadas significa o acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com a finalidade de obtenção de uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida em relação às técnicas convencionais. A cromatografia e a espectroscopia são técnicas analíticas químicas bastante utilizadas na análise de produtos advindos de plantas medicinais.

O acoplamento de técnicas de análise distintas deve fornecer informações adicionais à finalidade do experimento. Assim, ao unir métodos de separação como a cromatografia a líquido de alta eficiência e a cromatografia gasosa com técnicas espectrométricas como a espectrometria de ultravioleta UV-Vis, a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear, por exemplo, torna-se possível obter mais informações a respeito da estrutura química dos componentes da amostra, permitindo o uso das mesmas como detectores. É importante a escolha correta do tipo de detector, principalmente quando a amostra analisada está em nível de traços (RODRIGUES, 2006).

As técnicas de cromatografia a líquido de alta eficiência e espectrometria de massas combinam o poder da separação química de um analito com a habilidade de detecção seletiva e confirmação da identidade de uma molécula. A espectrometria de massas é um dos métodos mais sensíveis e seletivos de análise molecular, gerando informações sobre o peso molecular e também o padrão de fragmentação de uma molécula de analito. Assim, a informação obtida com a espectrometria de massas tem um valor inestimável para a confirmação da identidade do analito (PATEL, 2012). A análise bioanalítica quantitativa por CLAE-EM consiste em três etapas: pré-tratamento das amostras, cromatografia e detecção (DAMEN, 2009).

O espectrômetro de massas é um detector sensível e seletivo adequado à detecção de uma larga gama de compostos passíveis de ionização. A sua sensibilidade torna-o candidato à análise quantitativa, apesar dele não ser por natureza uma ferramenta quantitativa. A sua resposta depende da estrutura molecular do composto, podendo variar devido aos vários parâmetros relacionados ao instrumento e às condições experimentais, o que é facilmente corrigido utilizando-se um padrão interno (STOKVIS, 2005).

Avanços significativos no acoplamento CLAE-EM têm permitido seu uso como excelente ferramenta com elevada seletividade para a determinação de produtos naturais em fluidos biológicos (GRAY, 2010).

12 EFEITO MATRIZ

O efeito matriz é observado quando substâncias presentes na matriz biológica em análise coeluem com o composto avaliado e interferem com o sinal analítico, por isso, é de interesse sua avaliação para os métodos bioanalíticos convencionais, como: CLAE-FLU, CLAE-UV, e também CLAE-EM/EM. No caso desta última, as elevadas seletividade e

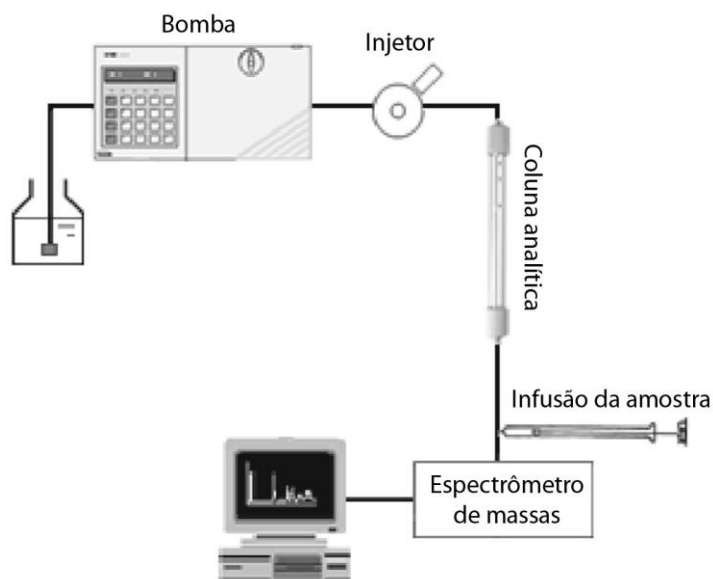
especificidade apresentadas em matrizes biológicas levam à maior propensão de erros, pois substâncias que não estejam sob monitoramento e que podem coeluir da matriz afetam a detecção de analitos, e comprometem a eficiência de ionização dos mesmos, o que caracteriza o efeito de matriz (CASSIANO; BARREIRO; MARTINS; *et al.*, 2009.).

Este efeito pode ser definido como um conjunto de efeitos indesejáveis originados da matriz biológica. Como resultado, pode-se observar uma supressão do sinal, ou aumento do mesmo, diminuição ou aumento na sensibilidade dos analitos durante um período de tempo, aumento da linha base, imprecisão de dados, alteração no tempo de retenção e distorção na forma do pico ou aparecimento de cauda cromatográfica (MALLET; JU; MAZZEO; 2004).

A extensão da supressão ou aumento do sinal depende do procedimento de extração da amostra e também é dependente das características do analito (PATEL; SHARMA; SANYAL; *et al.*, 2009). Vários métodos de preparo de amostras para análise por CLAE estão descritos na literatura. Como exemplo tem-se a precipitação de proteínas utilizando solvente orgânico, esta, porém, apresenta um efeito de matriz maior, se comparada à extração em fase sólida e à extração líquido-líquido (CASSIANO, 2009). Porém, devem-se considerar, no preparo das amostras, as suas características físico-químicas, sua estabilidade, além da separação cromatográfica obtida no melhoramento do método e os níveis de recuperação (XU; FAN; RIESER; *et al.*, 2005).

Uma das formas de avaliação da intensidade do efeito matriz pode ser realizada por adição pós-extração, na qual as respostas obtidas para as amostras cujos analitos de interesse foram adicionados pós-extração são comparadas com as soluções preparadas na fase móvel, sob as mesmas condições. Outra forma é a infusão pós-coluna, em que se utiliza uma bomba de infusão para produzir a vazão constante do analito (Figura 36). Esta infusão é realizada no eluente após a coluna cromatográfica e antes da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Uma amostra de branco de matriz (sem a adição do analito) é concomitantemente cromatografada nas condições pré-estabelecidas para o método, e registrada a resposta do analito infuso. Nesse método, pode-se verificar a influência da matriz na resposta do analito, que deve ter a concentração na mesma faixa em que será cromatografado, do contrário, a habilidade da fonte de ionização em gerar íons será dificultada, podendo gerar resultados errôneos (TAYLOR, 2005; SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY; 2004).

Figura 36 – Esquema de infusão pós-coluna (FONTE: CASSIANO, 2009).



13 MATERIAL E MÉTODOS

13.1 Reagentes e Material

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram: acetonitrila grau HPLC, CH_3CN , (Sigma-Aldrich); ácido fórmico 88 % PA, CH_2O_2 , (Vetec); água purificada (Elga Purelab Option-Q); clorofórmio grau HPLC, CHCl_3 , (Vetec); metanol grau HPLC, CH_3OH , (Merck); metil-terc-butiléter – MTBE grau HPLC, $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$ (Sigma-Aldrich); hexano grau HPLC, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (Merck).

Heparina sódica injetável (5000 UI/mL, Hemofol[®] Cristália)

Tubos para coleta de sangue da marca BD Vacutainer[®] contendo heparina.

Seringas estéreis descartáveis com volumes de 1 e 10 mL.

Colunas cromatográficas de fase reversa C_{18} , marca Gemini 150 x 4,6 mm, 5 μ , e C_8 , marca ACE, 125 x 4,6 mm, 5 μ .

13.2 Equipamentos

Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão) série 10Avp, constituído de duas bombas LC-10ADvp, módulo controlador SCL-10Avp e autoinjeter SIL-10ADvp, degaseificador (DGU-14A).

Espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quatro LC com fonte de ionização eletrospray e sistema de controle e processamento de dados com *software* MassLynx versão 3.5 (Micromass, Manchester, UK)

Agitador de tubos tipo vórtex KMC – 1300V (Vixar).

Bloco de secagem de amostra (Dri Block DB-3, Techne Sample Concentrator)

Centrífuga Mikro 200 (Hettich Zentrifugen)

Bomba de infusão direta (KDS100L - KDS 100 Infusion Pump)

13.3 Métodos

13.3.1 Preparo de soluções estoque e soluções de trabalho

Uma solução estoque na concentração 1 mg/mL foi preparada em acetonitrila e armazenada a – 20 °C, tanto para warifteína quanto para a metil-warifteína. Uma solução estoque na concentração de 0,5 mg/mL também foi preparada para a papaverina (PAP) usando como solvente metanol.

A partir dessas soluções, prepararam-se soluções de trabalho nas concentrações requeridas para o momento utilizando como solvente a acetonitrila e/ou uma mistura de acetonitrila e água.

13.3.1.1 Preparo de soluções de trabalho para obtenção de parâmetros de ionização no espectrômetro de massas por infusão direta

As soluções de trabalho utilizadas para obtenção de parâmetros de ionização no EM foram obtidas a partir de soluções estoque de warifteína e metil-warifteína previamente preparadas com acetonitrila na concentração de 1,0 mg/mL, e de papaverina preparada em metanol na concentração de 0,5 mg/mL.

Diluíram-se as soluções estoque (tanto de warifteína quanto de metil-warifteína) usando como solvente a acetonitrila, até a obtenção de soluções de trabalho na concentração de 1 µg/mL, e a partir dessas soluções, diluíram-se as amostras para as concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL preparadas em mistura de acetonitrila e água na proporção de 80:20.

A solução estoque de papaverina preparada em metanol foi diluída para obter solução de trabalho na concentração de 10 ng/mL em mistura de acetonitrila e água na proporção de 80:20.

As soluções de trabalho foram injetadas em aparelho de espectrometria de massas Quattro LC, triplo quadrupolo com ionização eletrospray no modo positivo por infusão direta usando bomba de infusão com seringa de 1000 µL, numa vazão de 100 µL/min. As transições de massas avaliadas foram 593,37 e 489,32 para a warifteína; 607,54 e 503,38 para metil-warifteína; 340,10 e 324,21 para a papaverina.

13.4 Condições cromatográficas para injeção de amostras em solução no sistema CLAE-EM/EM

As soluções de trabalho de warifteína e metil-warifteína nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, e de papaverina na concentração de 10 ng/mL, em mistura de acetonitrila e água na proporção 80:20 foram injetadas em sistema de CLAE-EM/EM utilizando fase móvel de acetonitrila e água com adição de ácido fórmico nas proporções de 80:20:0,2 (v/v), fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 30 µL.

As colunas cromatográficas utilizadas para injetar as amostras de WAR, Metil-WAR e PAP foram de fase reversa, C₁₈, da marca Gemini NX, 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula, e C₈ da marca ACE, 125 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula.

A solução de trabalho de papaverina, na concentração de 10 ng/mL, foi preparada em mistura de acetonitrila e água na proporção 80:20

13.5 Procedimento de obtenção de sangue e plasma de ratos

O sangue utilizado nesse estudo foi obtido de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando cerca de 250 g provenientes do Biotério Professor George Thomas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

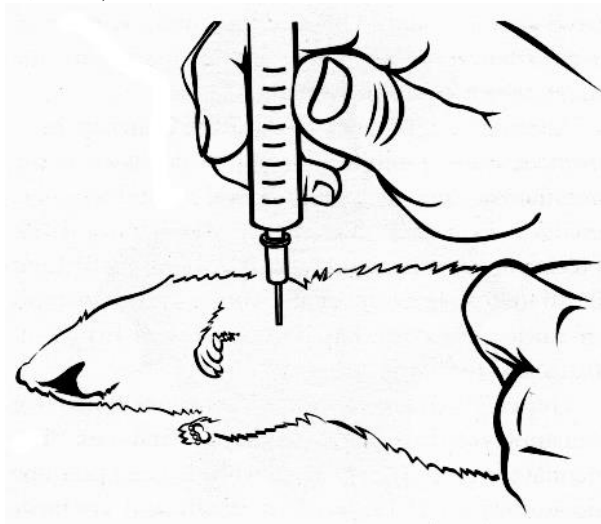
Os animais eram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C) e em ciclos de claro-escuro de 12 horas, sendo alimentados *ad libitum* com água e ração comercial. Os experimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do referido centro, número de certidão 0207/09.

Procedeu-se a retirada de sangue dos animais, após eutanásia por deslocamento cervical, pela técnica de punção cardíaca, coletando-se o sangue com seringas de 10,0 mL em tubos BD Vacutainer® contendo anticoagulante heparina sódica, jateado na parede interna do tubo com capacidade para volume total de 4,0 mL. As amostras de sangue eram imediatamente armazenadas a -20°C .

Para a retirada de sangue do animal eutanasiado, este era posicionado em decúbito lateral direito ou decúbito dorsal e localizava-se o coração posicionando-se o dedo indicador sobre o tórax, entre a quarta e sexta costela para percepção dos batimentos cardíacos. Introduzia-se a agulha (agulha e seringa previamente heparinizadas) perpendicularmente à parede torácica e ao penetrar no coração, aplicava-se uma leve sucção para aspiração do sangue coletando-se lentamente (Figura 37) (WEISS; TAYLOR; ZIMMERMANN; *et al.*, 2000).

Quando o objetivo era a obtenção de amostra de plasma do animal, o sangue coletado era imediatamente centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos a -4°C . Após centrifugação, o sobrenadante de plasma era cuidadosamente pipetado, transferido para tubos limpos e armazenado a -20°C até o momento de análise.

Figura 37 – Representação de técnica de coleta de sangue de rato por punção cardíaca (FONTE: WEISS *et al.*, 2000)



13.5.1 Preparo de amostras de sangue fortificado de rato

A partir de um *pool* de sangue de ratos prepararam-se amostras fortificadas com a warifteína para posterior análise em sistema CLAE-EM/EM com o método previamente estabelecido.

O preparo das amostras consistiu em contaminar o sangue com soluções preparadas previamente de warifteína em acetonitrila nas concentrações de 10 e 100 ng/mL. Dessas soluções, retirou-se uma alíquota de 100 µL para tubo limpo e completou-se com 900 µL de sangue, produzindo-se assim, amostras de sangue fortificado com warifteína nas concentrações de 1 e 10 ng/mL.

13.5.2 Procedimento de extração por precipitação de proteína de amostras de sangue de rato fortificado

Para a obtenção das amostras de sangue de rato fortificadas prepararam-se soluções de trabalho de warifteína nas concentrações de 10 e 100 ng/mL em acetonitrila.

A partir das amostras de sangue de rato fortificadas com warifteína retirou-se uma alíquota de 50 µL para tubo limpo, adicionou-se 100 µL de padrão interno e levou-se à agitação por 30 segundos em mesa agitadora. Completou-se com 350 µL de acetonitrila, agitou-se em mesa agitadora por dois minutos, levou-se à centrífuga durante seis minutos a 14000 RPM numa temperatura de 4 °C, retirou-se o sobrenadante para proceder-se à injeção em sistema CLAE-EM/EM.

13.5.3 Procedimento de extração por precipitação de proteínas de amostras de plasma de ratos fortificado

As amostras de plasma de rato eram obtidas por centrifugação de sangue fresco coletado em tubos heparinizados e estocadas a – 20 °C. Antes de iniciar a extração, as amostras eram descongeladas à temperatura ambiente. Para obtenção do plasma fortificado foram preparadas soluções de trabalho de warifteína em acetonitrila nas concentrações 100, 200, 500, 1000, 3000, 5000, 7000, 10.000 ng/mL.

Em tubo limpos, adicionou-se 180 µL de plasma de rato e em seguida, alíquotas de 20 µL de cada uma das soluções de trabalho de warifteína previamente preparadas, para

obter as concentrações de 10, 20, 50, 100, 300, 500, 700, 1000 ng/mL. O volume final de plasma fortificado era de 200 μ L.

Para a extração das amostras de plasma fortificado, retirou-se uma alíquota de 50 μ L das mesmas e transferiu-se para tubo limpo, adicionou-se 100 μ L de padrão interno (50 ng/mL), levando-se para agitação em vórtex por 30 segundos. Após essa agitação, adicionou-se 350 μ L de acetonitrila (volume total final = 500 μ L) e levou-se para a centrifugação por 6 minutos, numa rotação de 14000 RPM a 4 °C. Finalizada a centrifugação, retirou-se 230 μ L de sobrenadante para injeção em CLAE-EM/EM.

13.5.4 Procedimento de extração líquido-líquido de amostras de plasma de ratos para verificação de efeito matriz

Em tubos limpos, adicionou-se 50 μ L de branco de plasma de rato, e em seguida transferiu-se 450 μ L de uma alíquota de solvente extrator, os quais foram: clorofórmio, MTBE e hexano. Com a adição de solvente para extração, levou-se a amostra para agitação em vórtex por 10 e/ou 15 minutos por duas vezes.

A cada extração, retirou-se a fase orgânica transferindo-a para tubo limpo, e após finalizar as duas extrações, secou-se o solvente orgânico em bloco de secagem de amostras com nitrogênio.

Com as amostras secas, procedeu-se à ressuspensão do material seco com uma mistura de acetonitrila e água na mesma proporção da fase móvel agitou-se por 30 segundos em vórtex, retirou-se 500 μ L para tubos limpos e procedeu-se à injeção em CLAE-EM/EM.

13.5.5 Estimativa de limite de detecção de warifteína em plasma de ratos

Amostras de plasma fortificado com warifteína e papaverina na faixa de concentração de 1 a 1000 ng/mL de warifteína (com 50 ng/mL de papaverina) foram extraídas conforme procedimento descrito no item 4.5.3. Após extração, as amostras foram transferidas para tubos limpos e injetadas em sistema CLAE-EM/EM para identificação do limite de detecção.

As amostras coletadas após experimento de administração de warifteína em ratos (item 4.5.6) foram extraídas segundo o item 4.5.3 e após a extração retiraram-se alíquotas

de 250 μ L das amostras e diluiu-se com 750 μ L (volume total de 1000 μ L) de fase móvel (acetonitrila e água na proporção 80:20), utilizando-se essa diluição para a injeção no sistema CLAE-EM/EM. A curva de calibração para este experimento variou numa faixa de 0,1 a 40 μ g/mL.

13.5.6 Procedimento de administração do alcaloide warifteína e posterior coleta de sangue *in vivo* em ratos

Para a avaliação da farmacocinética do alcaloide warifteína *in vivo*, foi realizado experimento para a administração da warifteína em animais machos da espécie *Ratus wistar*. O protocolo de experimentação foi submetido, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal (CEUA) com o número de protocolo 0207/09.

A dose administrada de warifteína nos ratos foi de 1,0 mg/Kg. A preparação da warifteína para a administração nos animais foi realizada no mesmo dia do experimento. O alcaloide isolado era pesado para preparar uma solução na concentração de 1 mg/mL de forma a obter volume suficiente para administração nos animais de acordo com o peso em gramas dos mesmos. Pesando-se a amostra, adicionou-se em seguida dimetilsulfóxido (DMSO) para melhor solubilização do alcaloide uma vez que não era possível administrar solventes inorgânicos como veículos, assim, para finalização da solução a se administrar, utilizou-se como veículo solução salina 0,8 %.

Os animais eram separados um dia antes do experimento e deixados em jejum; pesados imediatamente antes do início do experimento e separados em grupos de três animais. O peso dos animais compreendia uma faixa entre 220 e 240 g.

A administração da warifteína em solução salina era realizada por via intravenosa com acesso pela veia caudal com seringas de 1,0 mL (do tipo para insulina). A técnica para administração da substância consistiu em imobilizar os animais em caixas de contenção (Figura 38), procedendo-se à assepsia da cauda com água morna, que ao mesmo tempo promovia a dilatação da veia caudal para melhor visualização do acesso venoso. Com a veia dilatada, esticou-se a cauda do animal de modo que a veia ficasse visível e inseriu-se a agulha da seringa paralelamente a cerca de 1,0 cm da ponta da cauda. Após a penetração da agulha na pele do animal, lentamente, administrou-se o conteúdo intravenosamente. Ao fim da administração da substância, segurou-se o local de administração fazendo-se uma

leve pressão retirando-se a agulha de forma a prevenir sangramento. A figura 39 representa o passo a passo da administração por venopunção em cauda de rato.

Figura 38 – Representação de técnica de contenção de rato usando aparato de contenção para venopunção e administração de substância na veia caudal (FONTE: <http://www.procedureswithcare.org.uk/intravenous-injection-in-the-rat/>)

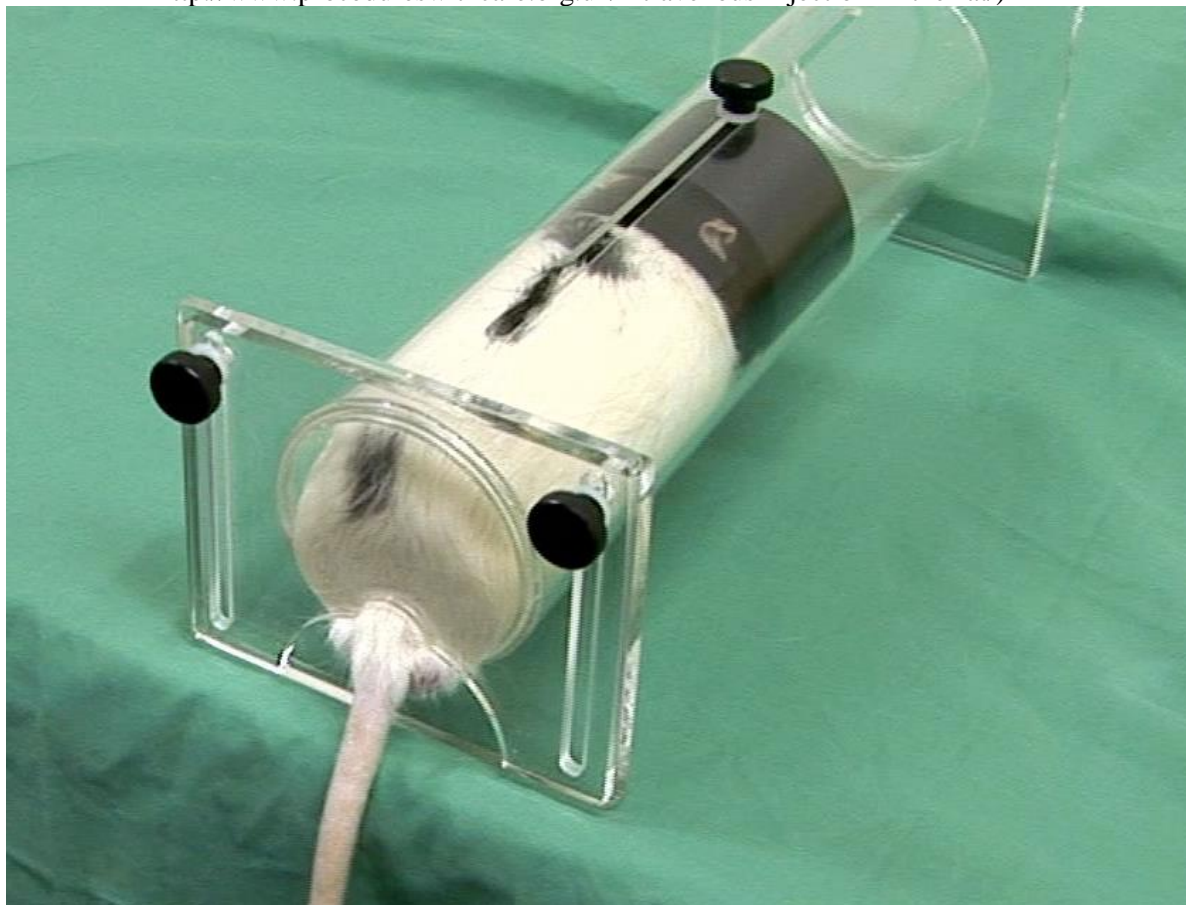


Figura 39 – Passo a passo da venopunção em cauda de rato para administração de warifteína



Passo 1: Imobilização, limpeza e dilatação da veia caudal com água morna



Passo 2: Posicionamento da seringa na veia dilatada com a cauda retesada



Passo 3: Penetração da agulha na pele e administração na veia



Passo 4: Retirada da agulha da veia e leve pressão local

O procedimento de coleta do sangue dos ratos após a administração de warifteína intravenosa foi através a técnica de amputação da ponta da cauda, que permite coletar volumes menores que 0,5 mL.

Após a administração da warifteína, cronometrou-se o tempo para coleta do sangue de cada animal obedecendo a seguinte ordem cronológica: 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Assim, para cada animal, foram coletadas amostras para os seis tempos.

No momento da coleta, o animal era novamente colocado na contenção, estimulou-se a dilatação da cauda com água morna, e em seguida, fez-se uma secção com tesoura cirúrgica na ponta da cauda, a cerca de 5 mm da extremidade. Massageou-se suavemente a cauda para estimular a passagem do sangue e coletaram-se as gotas em tubo limpo e heparinizado. Os tubos com sangue coletado eram posteriormente armazenados a – 20 °C até o momento de proceder-se à extração para análise em CLAE-EM/EM.

13.6 Avaliação de efeito matriz

Na avaliação do efeito matriz utilizou-se o método de infusão pós-coluna. Para tanto, as soluções de warifteína e de papaverina foram preparadas na concentração de 1000 ng/mL em acetonitrila e água (na proporção de 80:20) para injeção com bomba de infusão no espectrômetro de massas. Uma amostra de branco de matriz foi concomitantemente injetada no sistema CLAE nas mesmas condições pré-estabelecidas para o método analítico (item 4.4), registrando-se a resposta do analito.

A taxa de vazão para a infusão direta foi fixada em 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o sistema de CLAE tinha fluxo de 1,4 mL/min, assim, o fluxo foi dividido (1:2,8) usando um *split* antes da introdução no espectrômetro de massas.

13.7 Parâmetros farmacocinéticos avaliados

A cinética da warifteína foi avaliada após sua administração em dose única de 1 mg/Kg por via intravenosa em ratos. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática versus tempo pelo modelo não-compartimental.

Na farmacocinética não compartimental, a análise das curvas séricas é baseada na aplicação de critérios estatísticos para se obter os parâmetros representativos das mesmas, não se considerando a distribuição por compartimentos. Foram obtidos como parâmetros: a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$); o tempo em que a substância está presente na concentração máxima no plasma ($T_{\text{máx}}$); a área sob a curva do tempo zero ao último tempo do ponto da curva em que as concentrações foram mensuráveis (ASC_{0-t}), e a área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito ($ASC_{0-\infty}$).

Os valores de $C_{\text{máx}}$ e $T_{\text{máx}}$ foram obtidos diretamente dos dados originais mensurados para concentração plasmática; o cálculo de ASC_{0-t} foi realizado através da regra trapezoidal linear; para o cálculo de $ASC_{0-\infty}$ foi utilizada a equação $AUC_{0-t} + C_t/k_{el}$, em que C_t foi a última concentração mensurada, e K_{el} (constante de eliminação) foi calculada por análise de regressão linear da porção logarítmica linear da curva de concentração versus tempo plasmática.

Valores de $T_{\text{máx}}$ foram comparados através do teste de Wilcoxon. Aplicando-se o modelo não-compartimental ao logaritmo dos dados comparou-se $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$

por ANOVA. Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados como média e intervalo de confiança 95 %. As análises estatísticas e farmacocinéticas foram realizadas utilizando o software WinNonlin Professional®, versão 5.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, California).

14 RESULTADOS E DISCUSSÃO

14.1. Obtenção dos parâmetros de ionização para a warifteína através de infusão direta no espectrômetro de massas

Nesta etapa, contou-se com a colaboração do Núcleo de Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (NUDFAC), com o apoio da equipe do professor Dr. Danilo César Galindo Bedor da Universidade Federal de Pernambuco.

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa com a *Cissampelos sympodialis* Eichl. referente à processos de extração do alcaloide warifteína em fluido biológico mostraram ser possível a análise desse alcaloide usando a técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência e detector de UV com arranjo de diodo (UV/DAD), extraído de plasma humano mas apenas quando a concentração de warifteína estava acima de 1 µg/mL.

O presente trabalho tem como um dos objetivos o desenvolvimento de um método utilizando espectrometria de massas para quantificação de warifteína em concentrações da ordem de ng/mL que possa permitir a obtenção de parâmetros cinéticos para a administração *in vivo* do alcaloide. Sendo assim, a partir do isolamento e purificação da warifteína, realizaram-se análises em CLAE-EM/EM para determinação dos parâmetros da substância por esta técnica de forma a prever as análises em matriz biológica.

Inicialmente, realizaram-se infusões diretas no espectrômetro de massas do alcaloide warifteína para verificação das condições de infusão no equipamento. Soluções de trabalho da amostra em mistura de acetonitrila e água na proporção de 80:20 nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL, foram infundidas no CLAE-EM/EM e chegou-se ao limite de detecção da warifteína de 1 ng/mL.

O uso de padrões internos para a quantificação de analitos em fluidos biológicos é de suma importância para compensar os erros relacionados com o preparo de amostras, bem como erros instrumentais. Métodos de padrão interno são geralmente utilizados para

melhorar a precisão e exatidão de medidas, por conseguinte, torna-se importante incluí-los para medidas quantitativas em fluidos biológicos (GRAY, 2010).

Uma vez que se necessita de um padrão interno (PI) para a avaliação e a validação de um método bioanalítico, escolheu-se como analito o alcaloide metil-warifteína, pois o mesmo possui grande similaridade estrutural com a warifteína, tendo sido isolado e purificado conjuntamente com mesma. Assim, obteve-se seus parâmetros no espectrômetro de massas, por infusões diretas de soluções de trabalho em mistura de acetonitrila e água na proporção de 80:20 nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL, chegando-se ao limite de detecção da metil-warifteína de 1 ng/mL.

Para a obtenção das melhores condições de ionização dos analitos, variaram-se os parâmetros: capilar (2,0 – 4,5 Kv), cone (30 – 50 V), colisão (20 – 30 V). Com os limites de detecção identificados para a warifteína e o padrão interno escolhido para o estudo, a metil-warifteína, chegou-se aos parâmetros necessários para a análise das substâncias.

Para a warifteína, a partir de sua infusão direta, foi possível detectar seu íon pai de massa molecular m/z 593,366 a uma intensidade de sinal da ordem de $7,14 \times 10^7$ (Figura 40) e seu íon filho em m/z 489,293 com intensidade de sinal da ordem de $3,79 \times 10^8$ (Figura 41). Na tabela 8 observamos os parâmetros obtidos para o espectrômetro de massas.

Figura 40 – Espectros de massas para o íon pai da warifteína m/z 593,366, na concentração de 1 ng/mL

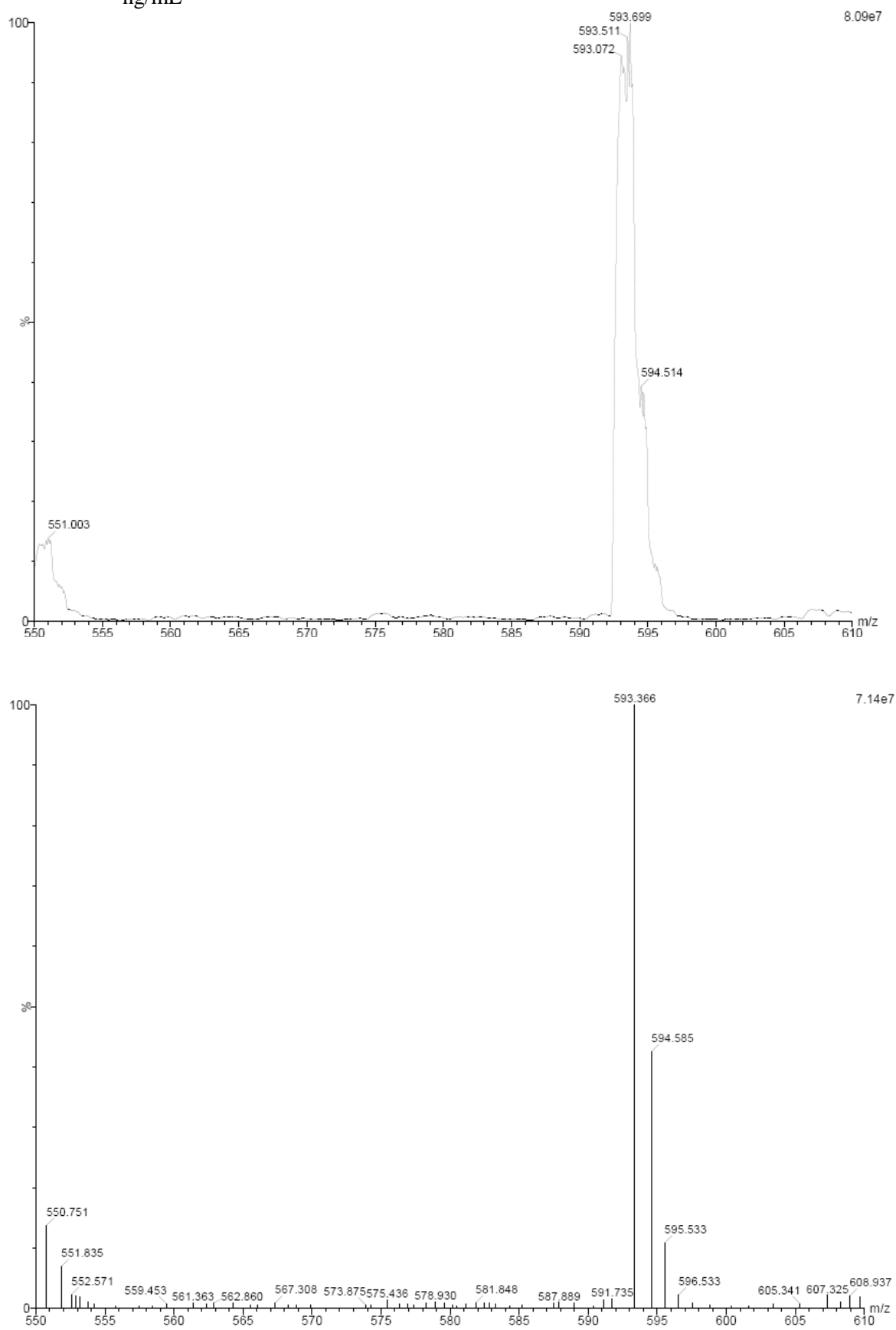


Figura 41 – Espectros de massas para o íon filho da warifteína (m/z 489,293), na concentração de 1 ng/mL

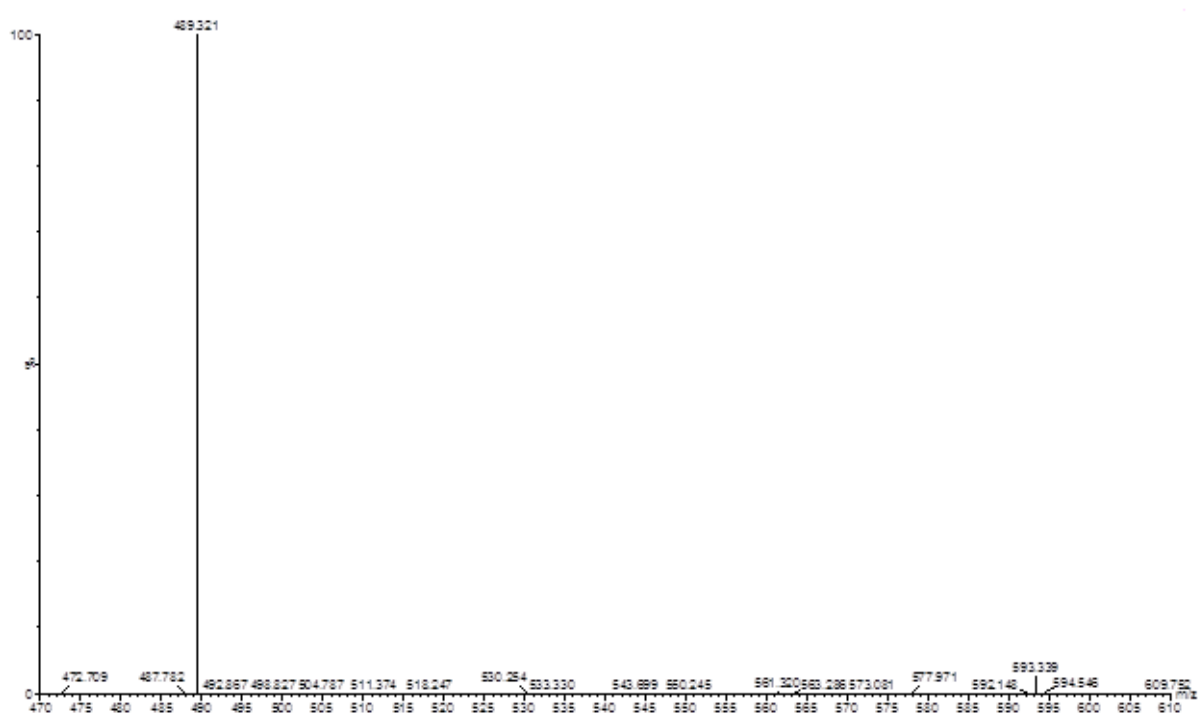


Tabela 8 Parâmetros de espectrometria de massas de baixa resolução para a warifteína

Íon filho	Massa inicial	440,0
	Massa final	660,0
	Massa procurada	593,37
Capilar (kV)		3,50
Cone (V)		43
Extrator (V)		4
RF (V)		0,1
Colisão (V)		26
Temperatura da fonte (°C)		70
Temperatura de dessolvatação (°C)		200
Fluxo de gás do cone (L/h)		Desligado
Fluxo de gás de dessolvatação (L/h)		337

A infusão direta para a metil-warifteína possibilitou a detecção de seu íon pai de massa molecular m/z 607,540 a uma intensidade de sinal da ordem de $1,38 \times 10^7$ (Figura 42) e seu íon filho em m/z 503,380 com intensidade de sinal da ordem de $5,14 \times 10^8$ (Figura 43). Na tabela 9 observamos os parâmetros obtidos para o espectrômetro de massas.

Figura 42 – Espectro de massas para o íon pai (m/z 607,540) da metil-warifteína na concentração 1ng/mL.

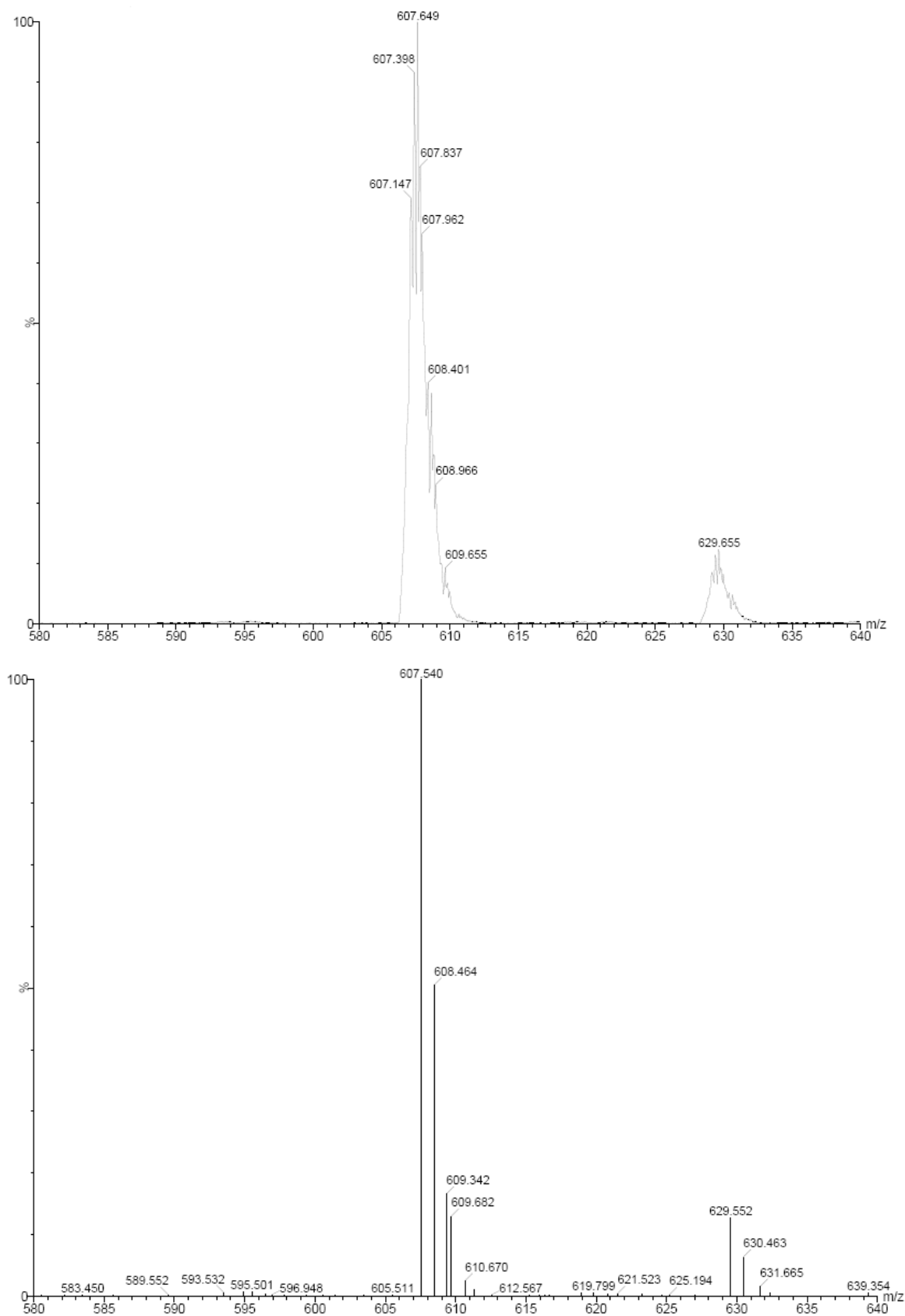


Figura 43 – Espectro de massas para o íon filho (m/z 503,380) da metil-warifteína na concentração 1 ng/mL

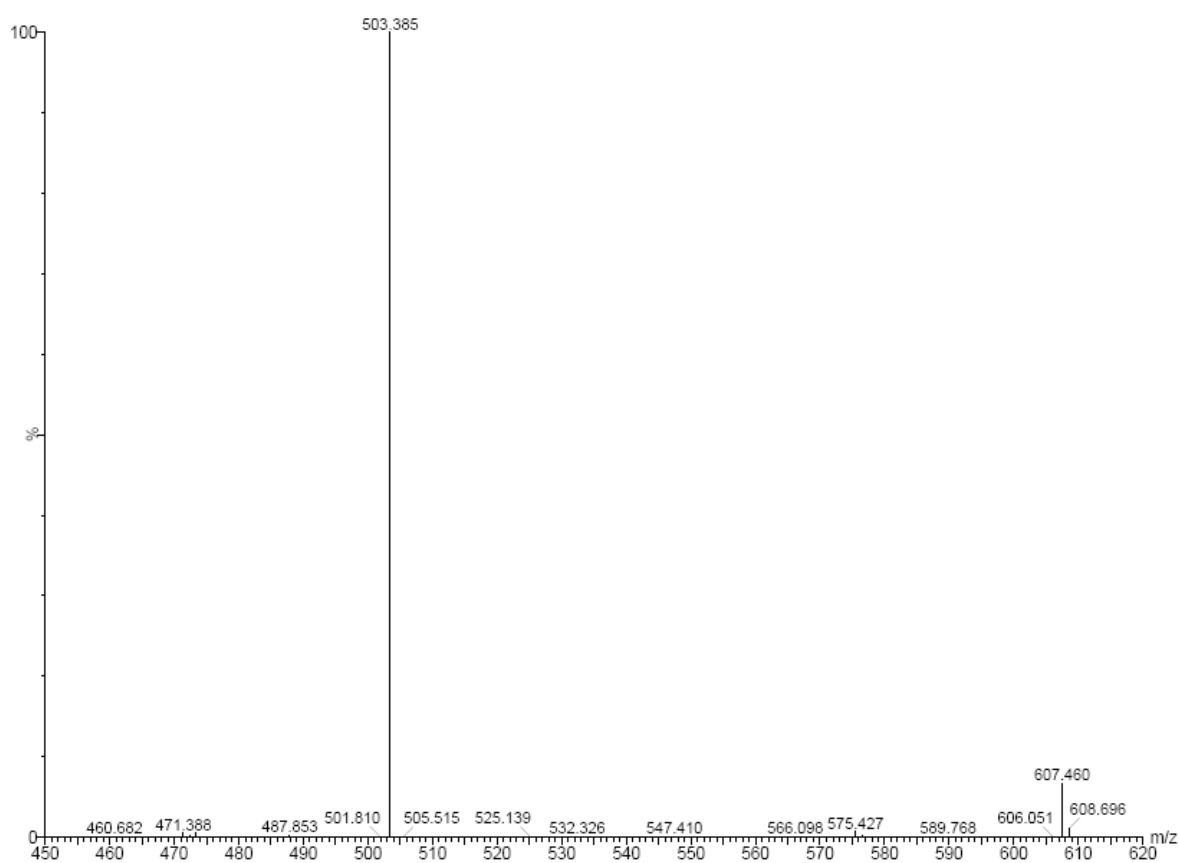
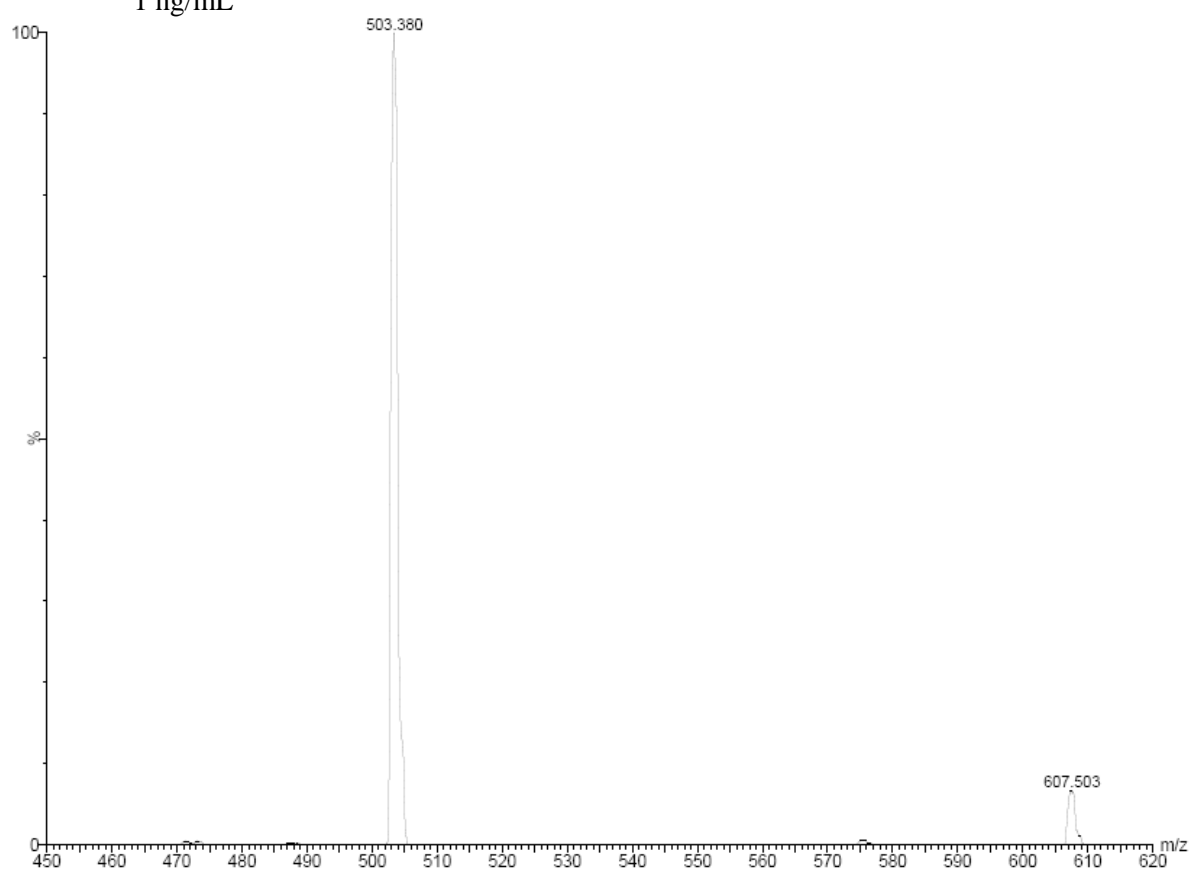


Tabela 9 Parâmetros de espectrometria de massas de baixa resolução para a metil-warifteína

	Massa inicial	250,0
Íon filho	Massa final	650,0
	Massa procurada	607,54
Capilar (kV)		3,50
Cone (V)		43
Extrator (V)		4
RF (V)		0,1
Colisão (V)		24
Temperatura da fonte (°C)		70
Temperatura de dessolvatação (°C)		200
Fluxo de gás do cone (L/h)		Desligado
Fluxo de gás de dessolvatação (L/h)		334

14.2 Obtenção dos parâmetros cromatográficos para injeção em sistema CLAE-EM com amostras em solução

Apesar da detecção por espectrometria de massas permitir que separações cromatográficas, bem como o pré-tratamento de amostras sejam menos elaboradas do que a detecção por ultravioleta, ainda existem componentes constituintes da matriz biológica que podem, embora não detectados, interferir na análise do analito através de supressão iônica. Dessa forma, o pré-tratamento e a separação cromatográfica para a determinação por CLAE-EM são objetivos na separação do analito de sua matriz biológica (STOKVIS, 2005).

As condições experimentais para a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência foram determinadas de forma a garantir a análise em CLAE-EM/EM. Como os limites de detecção em espectrometria de massas para ambos os alcaloides avaliados, a warifteína e a metil-warifteína, foram estabelecidos, partiu-se para a análise cromatográfica.

Partindo-se de uma solução mãe de warifteína na concentração de 1 µg/mL, preparada em acetonitrila, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, procedendo-se da mesma forma para o preparo das soluções de metil-warifteína.

Um estudo anterior realizado por Marinho (2008) desenvolveu e validou um método em CLAE com detecção por ultravioleta, para a quantificação de warifteína em

extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. No mesmo, a fase móvel utilizada era formada por uma mistura de água, acetonitrila e trietilamina, nas proporções 57:43:0,05 (v/v), com fluxo de 1,3 mL/min.

Nosso estudo partiu de fase móvel também composta por mistura de acetonitrila e água, usando coluna cromatográfica de fase reversa. As injeções em sistema CLAE-EM foram realizadas inicialmente em coluna de fase reversa C₁₈, da marca Gemini, 150 x 4,6 mm, 5 µm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água com adição de ácido fórmico, nas proporções 80:20:0,2 (v/v), o fluxo foi 0,5 mL/min e o volume de injeção foi de 30 µL.

Com as injeções tanto da warifteína quanto da metil-warifteína nas condições estabelecidas, foi possível a obtenção de cromatogramas (Figuras 44 e 45, respectivamente) adequados para ambas as substâncias, e a partir disso, a realização de testes com amostras de sangue contaminadas com as mesmas.

Figura 44 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostra de warifteína em solução nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, (A e B, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.

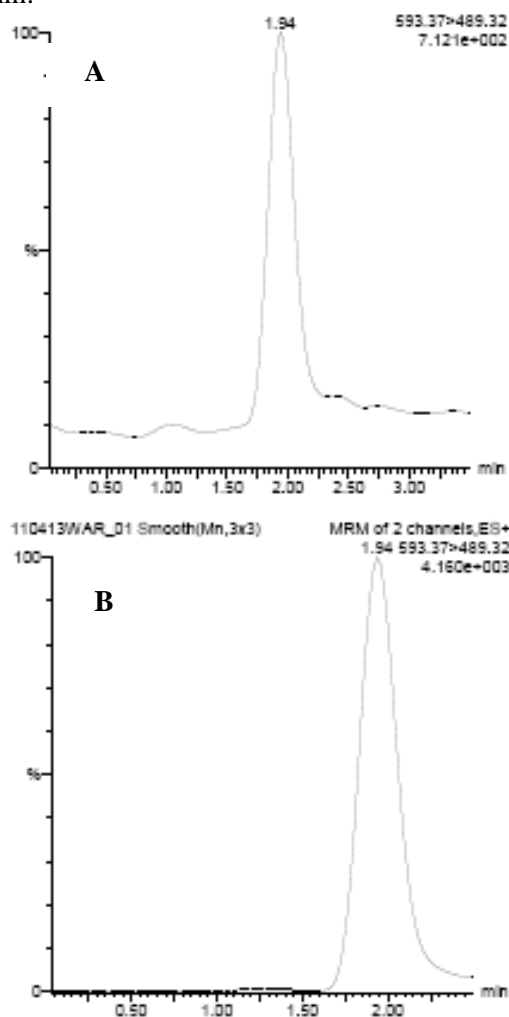
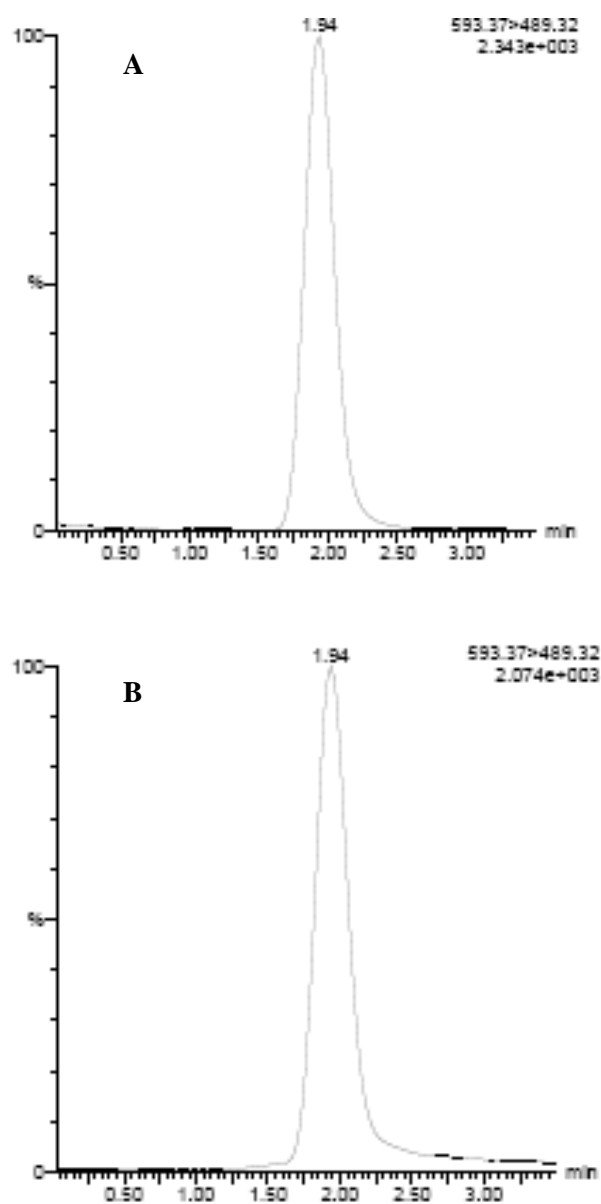


Figura 45 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostra de metil-warifteína em solução nas concentrações de 1 e 100 ng/mL, (A e B, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.



14.3 Obtenção dos parâmetros cromatográficos para injeção em sistema CLAE-EM com amostras de sangue fortificado

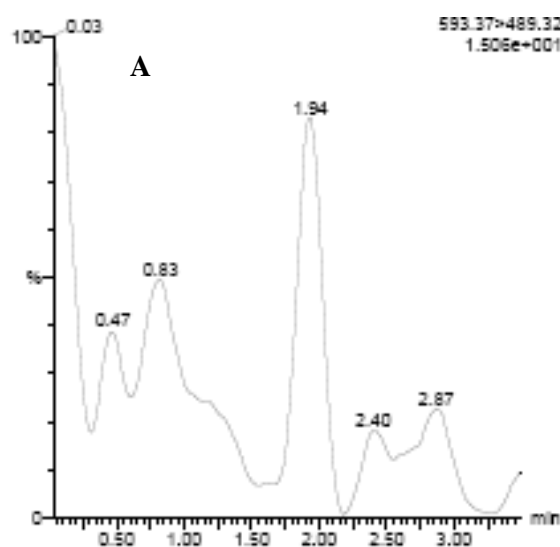
No desenvolvimento de um método cromatográfico, o maior objetivo é a separação do analito alvo do estudo. Numa análise para fins de quantificação da amostra investigada, isto significa a sua separação da matriz na qual se encontra, bem como de qualquer interferente (impureza) presente.

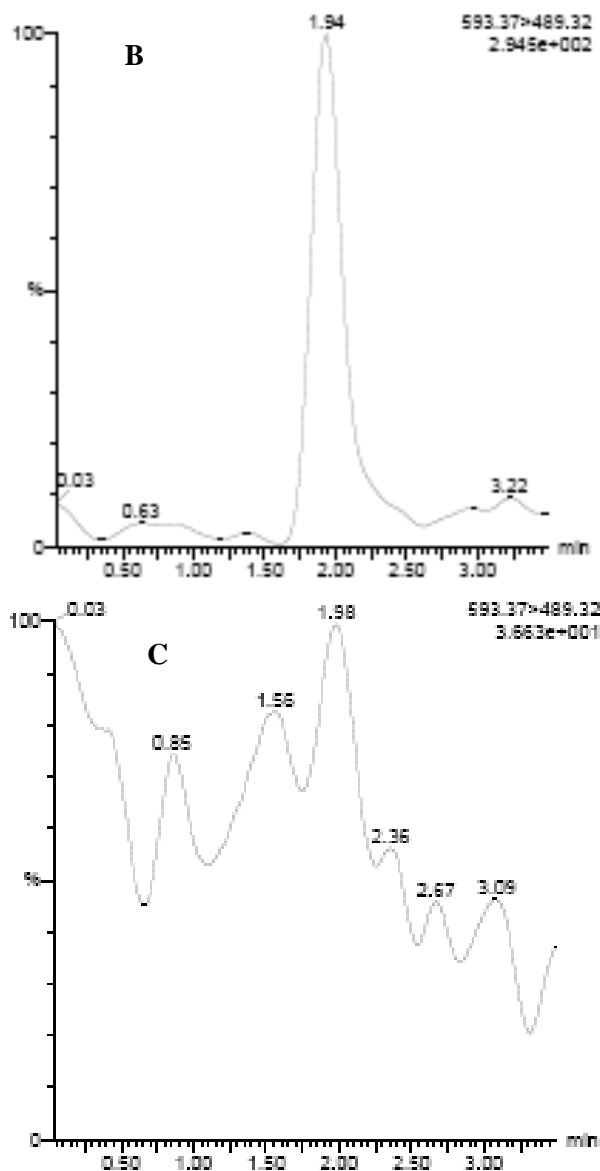
Uma etapa não menos importante a se considerar no desenvolvimento de qualquer método é o pré-tratamento das amostras anterior às suas análises. Ainda, a análise de amostras biológicas requer métodos rápidos, fáceis e de elevada eficiência que possam ser utilizados na rotina.

A partir da obtenção de cromatogramas de warifteína e metil-warifteína em solução, partiu-se para a análise dessas substâncias em amostras de sangue fortificado com as mesmas. Para tanto, utilizou-se como matriz biológica um *pool* de sangue de ratos para preparar amostras nas concentrações de 1 e 10 ng/mL.

As análises dessas amostras possibilitaram a identificação da warifteína nas mesmas, mostrando que o método proposto pela técnica de CLAE-EM tem sensibilidade para ler o alcaloide em amostras de sangue extraído com acetonitrila (Figura 46).

Figura 46 – Cromatogramas em sistema CLAE-EM de injeção de amostras de sangue de ratos fortificadas com warifteína e extraídas com acetonitrila nas concentrações de 1 e 10 ng/mL e branco (A, B e C, respectivamente), tempo de retenção 1,94 min.





Normalmente, a escolha de um padrão interno baseia-se na similaridade do composto com o analito. Mas em relação aos compostos medicinais derivados de plantas, geralmente, faz-se necessário avaliar a concentração de múltiplos componentes que são estruturalmente diferentes. Por consequência, a escolha de um padrão ou padrões internos torna-se uma tarefa árdua, posto que deve haver um razoável grau de similaridade estrutural, ou ser um composto que tenha uma relação de sinal padrão/padrão interno bem definida, não estar presente na matriz, além de exibir seletividade analítica, como por exemplo tempo de retenção ou relação massa/carga únicos (GRAY, 2010).

A metil-warifteína havia sido escolhida inicialmente pela sua semelhança estrutural com a warifteína, por estar presente na planta e ter sido obtida com elevado grau

de pureza também (98,52 %, Figura 15, pág. 72). Porém, observou-se que nas amostras injetadas preparadas a partir de sangue fortificado com a warifteína, mas sem o padrão interno (metil-warifteína), ainda era possível a leitura do PI nas amostras (Figura 47 e 48). Como não havia sido feita a contaminação das amostras com o PI, conjecturou-se que a warifteína estaria contaminada com o PI, ou seja, impura; ou ainda formando a metil-warifteína no processo de injeção no sistema CLAE-EM por alguma reação durante o processo. Embora a warifteína tenha sido obtida com elevado grau de pureza (99,79 %, Figura 14, pág. 71) para um produto natural, ainda foi possível para uma técnica tão sensível como a espectrometria de massas ler resquícios da metil-warifteína presentes na amostra que se apresentara pura por CLAE-PREP/UV-DAD, impossibilitando o uso da metil-warifteína como PI.

A detecção por ultravioleta, índice de refração ou detecção por fluorescência medem apenas a soma de contribuições individuais para o sinal geral obtido pelo equipamento. O espectrômetro de massas, porém, tem como grande vantagem a sua habilidade de não apenas indicar a presença de impurezas, mas também de fornecer o peso molecular das mesmas imediatamente, além de fazer a diferenciação entre as impurezas presentes.

Um aspecto crucial no desenvolvimento de um método cromatográfico é a separação do analito investigado. Para a quantificação de um analito em análise farmacêutica, faz-se necessário a separação do mesmo de qualquer impureza ou produto de degradação. As baixas concentrações, da ordem de menos de 0,1 % em relação ao analito, dificultam a identificação de substâncias coelundo com o analito de interesse. A comparação de espectros de ultravioleta pode ser utilizada para investigar a homogeneidade de um pico, mas é limitada em relação ao pico principal. Ainda, é necessário que haja uma diferença espectral suficiente entre o analito e a impureza, o que nem sempre é possível, visto que impurezas e produtos de degradação têm geralmente propriedades semelhantes às do analito; assim, torna-se difícil detectar níveis muito baixos (menores que 1 %) de impurezas coelundo com o analito com detector UV-DAD (ERMER, 2000).

Figura 47 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína extraída de sangue de ratos na concentração de 10 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 1,94 min, fase móvel ACN:H₂O:Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).

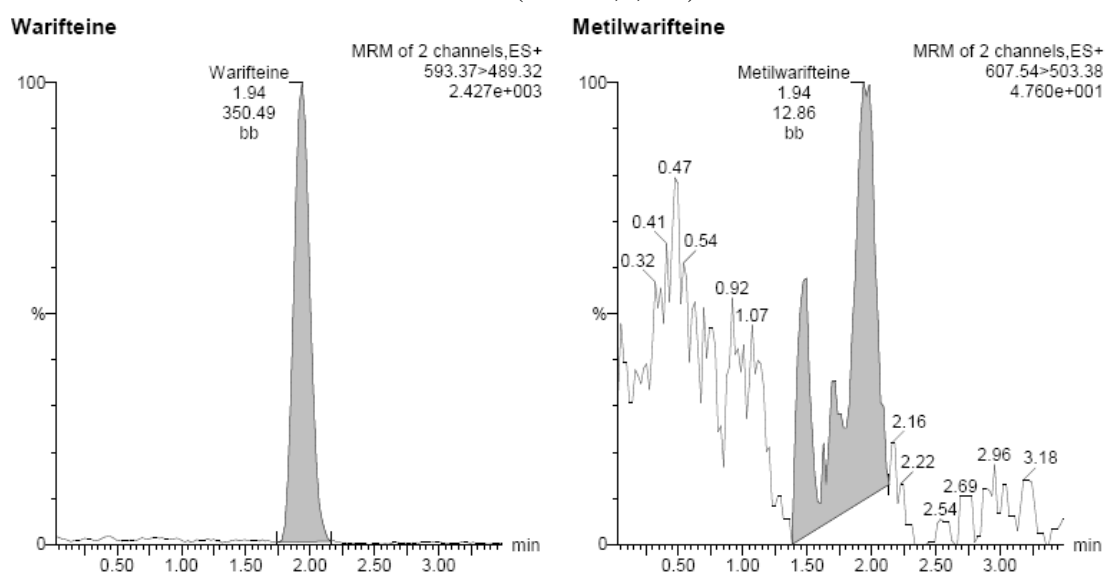
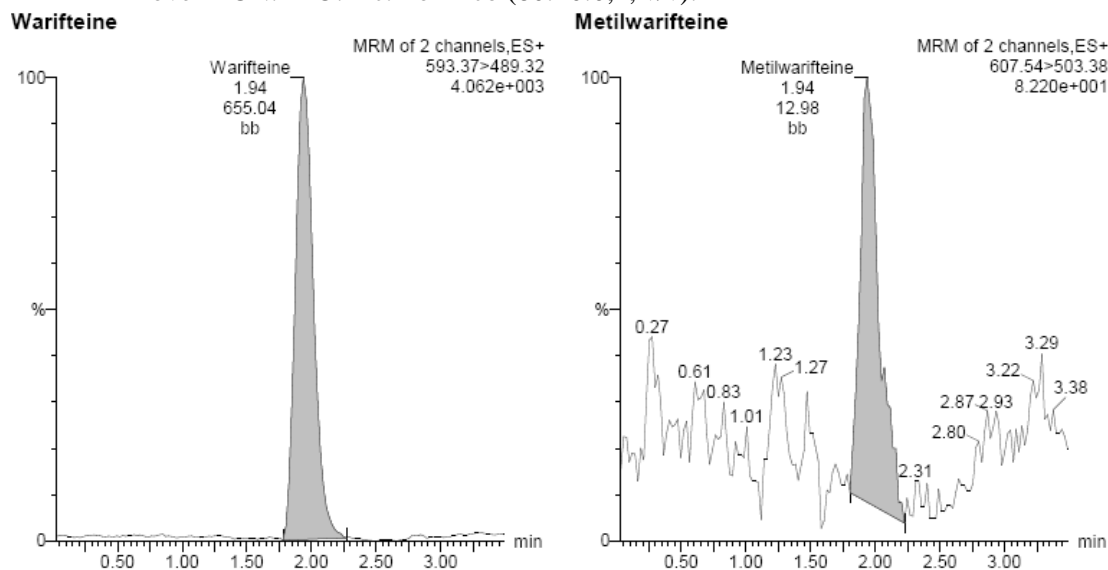


Figura 48 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína extraída de sangue de ratos na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 1,94 min, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



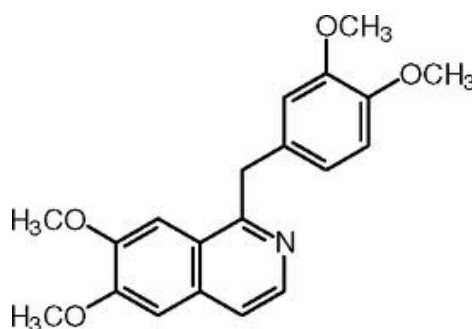
Nas figuras 47 e 48 é possível observar a presença de metil-warifteína nas amostras de sangue fortificadas somente com a warifteína, e embora a intensidade do sinal seja baixa, isso torna inviável o uso da metil-warifteína como PI. Uma vez que não era possível identificar a origem da formação da metil-warifteína, sugeriu-se a utilização de outra substância como padrão interno para as análises.

15 Ajuste de padrão interno

O uso do padrão interno em análises garante a atenuação de problemas gerados pela incerteza de volume de amostra aplicado, assim, obtêm-se resultados melhores que na ausência do mesmo, pois qualquer alteração no volume de amostra aplicado afetará na mesma proporção as áreas do analito e do PI. Uma vez que sem o padrão interno não se tem um parâmetro de comparação para as áreas obtidas dos analitos, justifica-se a importância de uma escolha adequada do mesmo.

Dada a não adequabilidade da metil-warifteína como PI nas análises, partiu-se para a escolha de um novo analito que se ajustasse às análises. Como o analito foco, a warifteína, é um alcaloide, avaliou-se a possibilidade de uso de outro alcaloide, com estrutura próxima à da warifteína, sendo avaliado para uso como PI a partir de então, a papaverina (PAP), alcaloide de núcleo isoquinolínico de fórmula estrutural $C_{20}H_{21}NO_4$ (Figura 49).

Figura 49 – Estrutura do alcaloide isoquinolínico papaverina



Realizou-se infusão direta para identificação dos parâmetros do PI em espectrômetro de massas utilizando-se solução de trabalho de papaverina preparada em mistura de acetonitrila e água na concentração de 10 ng/mL.

A partir das infusões diretas de PAP, foi possível estabelecer as condições no espectrômetro de massas e obter espectros de seu íon pai m/z 340,141 e de seu íon filho m/z 324,214 (Figura 50). Identificados o íon pai e o íon filho, partimos para o ajuste do método no sistema CLAE-EM, em que, a princípio, utilizaram-se as mesmas condições outrora usadas para a warifteína com a metil-warifteína como padrão. Nesta análise, a PAP mostrou um pico cromatográfico no tempo de retenção de 2,45 min (superior ao da war, 1,94 min), como podemos observar na figura 51.

Figura 50 – Espectro de massas para o íon filho (m/z 324,214) da papaverina na concentração de 10 ng/mL

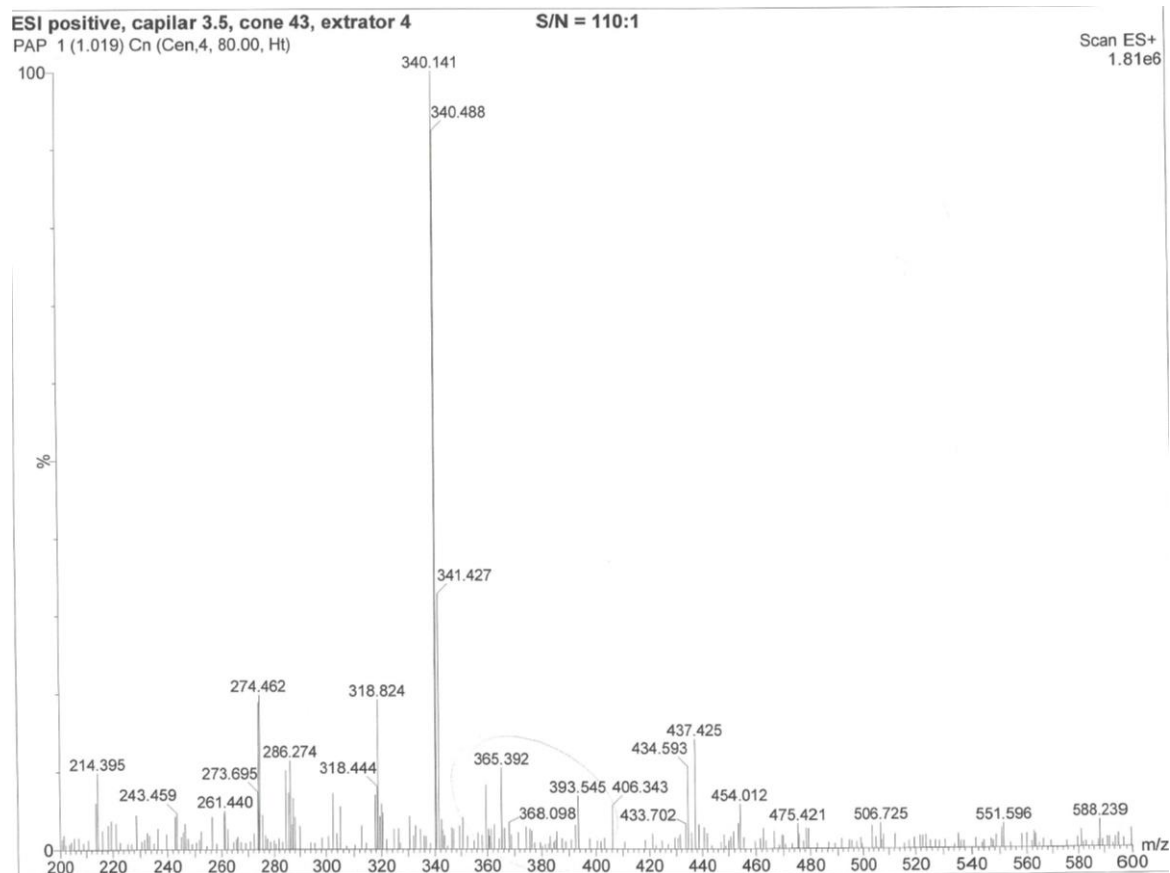
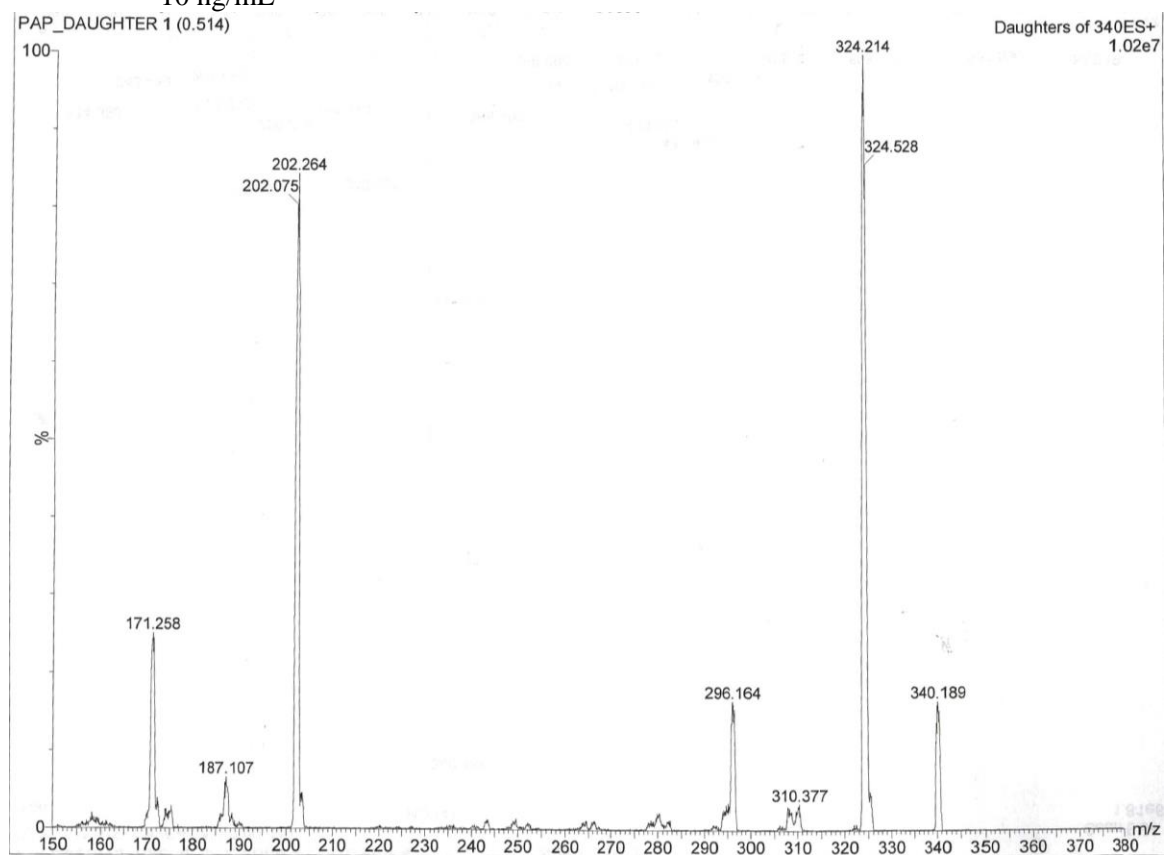
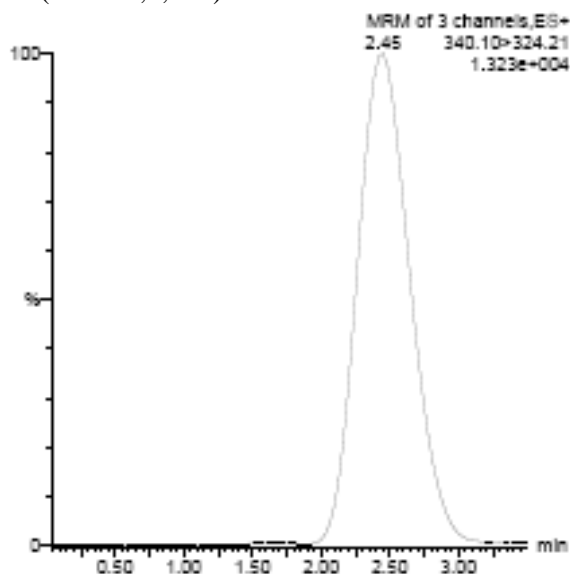
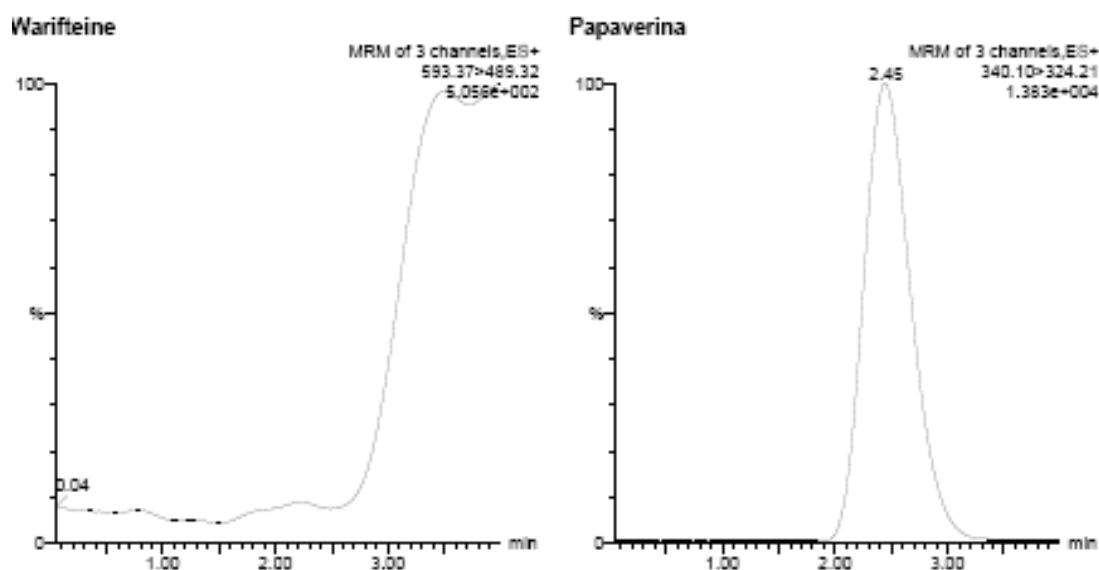


Figura 51 – Cromatograma de injeção de amostra de papaverina em solução na concentração de 10 ng/mL em sistema CLAE-EM, tempo de retenção 2,45 min, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



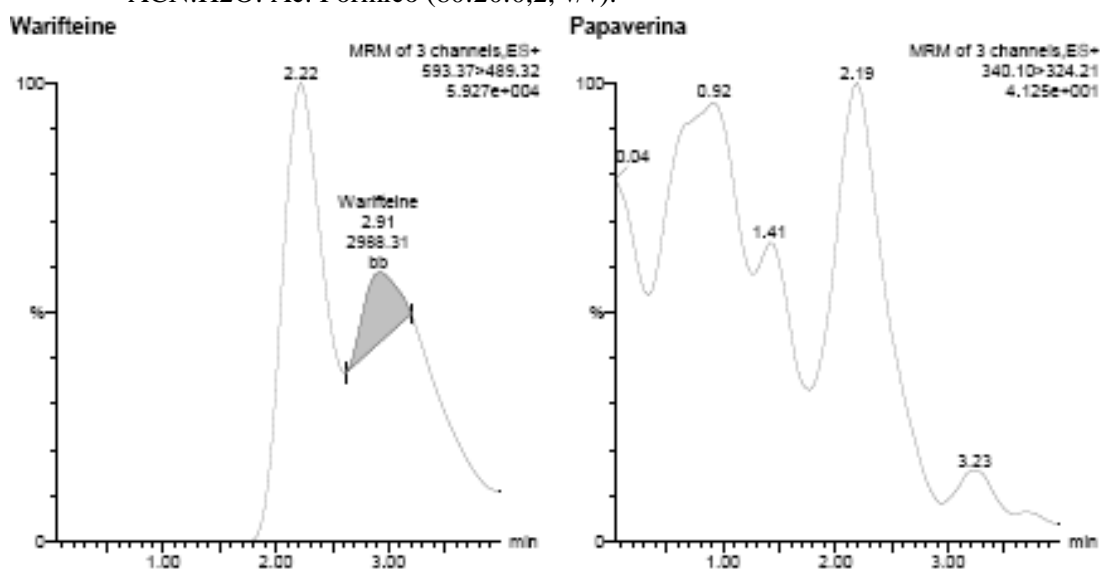
Uma vez que as condições para a papaverina em sistema CLAE-EM poderiam ser as mesmas previamente estabelecidas para a warifteína, injetou-se uma amostra de warifteína contaminada com o padrão interno PAP na concentração de 5 ng/mL para ambas, preparada em mistura de acetonitrila e água (Figura 52).

Figura 52 – Cromatograma de injeção de amostras de warifteína e papaverina em solução na concentração de 5,0 ng/mL em sistema CLAE-EM, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Na figura 52, não se observa o pico da warifteína injetada juntamente com a papaverina, ambas na concentração de 5 ng/mL. Uma confirmação de injeção da warifteína foi realizada, utilizando-se uma solução mais concentrada do alcaloide, preparada em acetonitrila e água, na concentração de 100 ng/mL (Figura 53). Porém, novamente não foi obtido um sinal para a warifteína.

Figura 53 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₁₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Este fato sugeriu haver problemas referentes à coluna cromatográfica utilizada, que era uma C₁₈, e levou-nos a testar uma coluna de preenchimento C₈, na tentativa de verificar se um empacotamento menor melhoraria a retenção da warifteína. Assim, com uma coluna C₈, realizou-se injeção no sistema CLAE-EM de amostras de warifteína e de papaverina na concentração de 100 ng/mL (Figuras 54 e 55, respectivamente), mantendo os parâmetros como descritos anteriormente. Dessa forma, foi então, possível ler ambos os picos para a warifteína e o PI papaverina, utilizando-se a partir disto uma coluna cromatográfica de empacotamento C₈, da marca ACE, de dimensões 125 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µ.

Figura 54 – Cromatograma de injeção de amostra de warifteína em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).

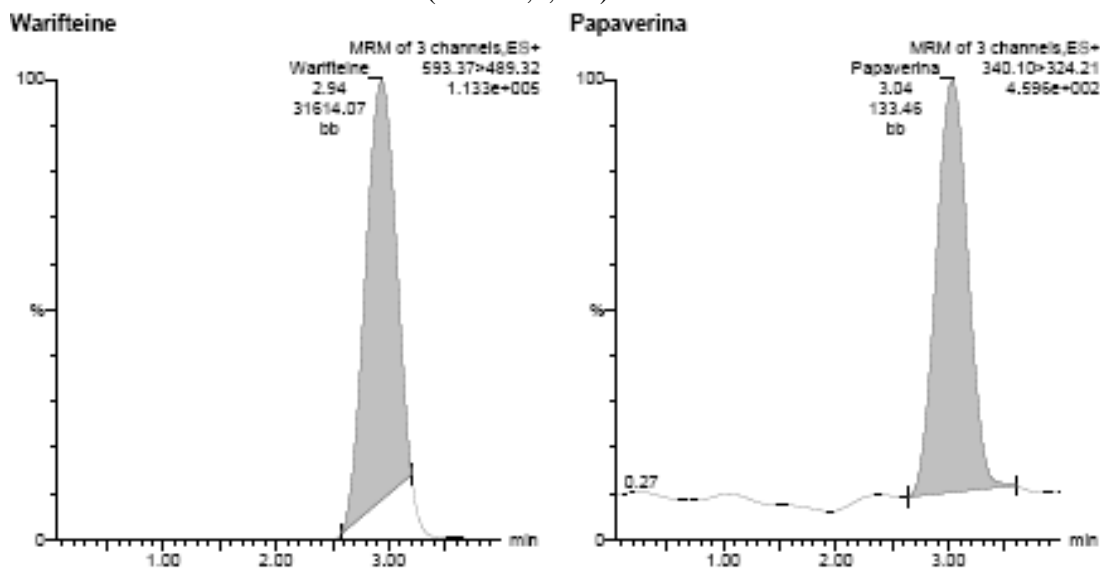
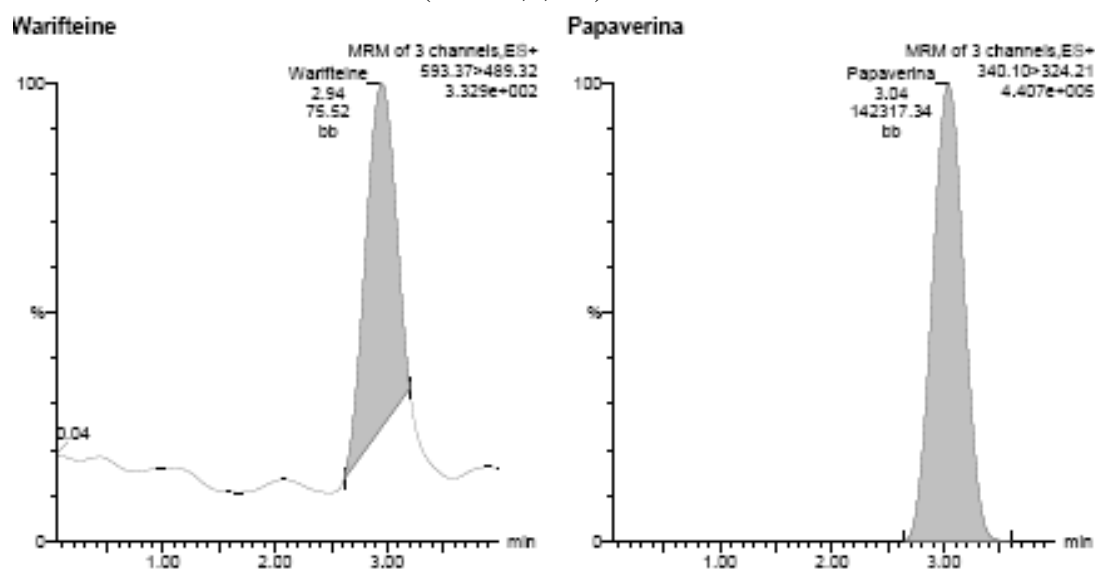


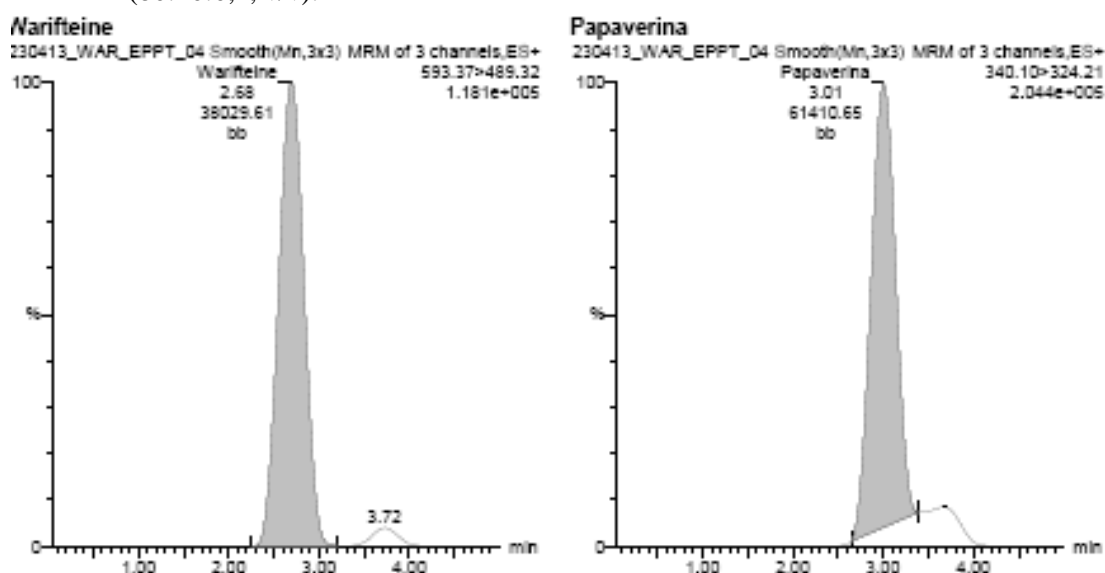
Figura 55 – Cromatograma de injeção de amostra de papaverina em solução na concentração de 100 ng/mL em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Uma vez definido o PI a ser trabalhado e otimizados os parâmetros de uso da técnica CLAE-EM/EM, avaliou-se o método de extração agora com a utilização de PAP. Para tanto, foram extraídas amostras de sangue obtendo-se a concentração final de 500 e 100 ng/mL, para a warifteína e a papaverina, respectivamente. O cromatograma para essas amostras está representado na figura 56. O método de extração possibilitou a obtenção de

warifteína e do PI papaverina nas concentrações utilizadas, sendo possível a identificação desses alcaloides em sistema CLAE-EM/EM com excelente resolução.

Figura 56 – Cromatograma de injeção de amostras de warifteína e papaverina extraídas de sangue de rato nas concentrações de 500 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente, em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Uma vez que foi possível a detecção da warifteína do PI papaverina em amostras de sangue de ratos extraídas com acetonitrila, a partir desses resultados, construiu-se uma curva de calibração para avaliar a linearidade do método.

16 Avaliação da linearidade do método

A relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito é dada pela curva de calibração. Faz-se necessário a obtenção de uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica. Deve-se construir a mesma com, no mínimo, 6 a 8 concentrações conhecidas do analito adicionadas na mesma matriz biológica para a qual o método desenvolvido será aplicado, essas concentrações devem, ainda, contemplar um intervalo de variação esperado, desde o limite de quantificação da amostra até 120 % da concentração máxima a ser analisada, realizando-se também, a análise da amostra do branco (aquela isenta de adição de analito e de padrão interno) (CASSIANO, 2009).

Difícilmente se conhece a correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada. Então, essa determinação é feita empiricamente, a partir dos sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação da reta chamada de curva analítica (THOMPSON; ELLISON; WOOD; 2002).

A aceitação da curva de calibração segue normas de agências reguladoras oficiais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por exemplo. A qual determina um coeficiente de variação menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação e menor ou igual a 15% para as demais concentrações. Além disso, o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

O tipo de padronização para a construção da curva de calibração está relacionado ao à análise e ao tratamento dado à amostra, o mesmo deve ainda, fornecer a melhor exatidão possível, além de elevado nível de precisão (RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; *et al.*, 2004).

O método de padronização interna permite avaliar a variação da resposta em função de manipulações da amostra (concentração, extração, preparo de amostra). O mesmo consiste na preparação de padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa do padrão interno. É o método de escolha para análises em matrizes biológicas, quando não se trabalha com injeção direta de amostras. Os resultados são expressos através de gráfico de regressão linear elaborado pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) com as concentrações do analito e na aplicação do método, as amostras desconhecidas são analisadas após a adição da mesma quantidade do padrão interno (CASSIANO, 2009).

A avaliação da linearidade do método de extração e quantificação de warifteína em plasma de rato foi realizada utilizando-se o método de padronização interna, no qual o PI foi o alcaloide de núcleo isoquinolínico papaverina, que demonstrou características compatíveis para uso enquanto PI uma vez que também é identificado no método proposto, e seu tempo de retenção é próximo e diferente do tempo de retenção para o composto alvo warifteína. A curva de calibração estimada para análise de linearidade do método foi construída utilizando-se a faixa de variação de 10 a 1000 ng/mL do analito.

Num método bioanalítico, geralmente são utilizados intervalos de concentração muito amplos, gerando maiores desvios nas concentrações mais altas, o que pode

influenciar a regressão linear de forma mais intensa do que os pequenos desvios apresentados por concentrações mais baixas (heteroscedasticidade). A média dos valores encontrados para cada concentração é o valor aceito, e o desvio padrão da média é calculado para cada concentração, sendo assim, as incertezas (erros aleatórios) não representam a curva de calibração como um todo, uma vez que se tratam de incertezas pontuais. A dispersão das medidas (valores de y) deve ser independente da concentração do padrão de calibração, obedecendo a uma distribuição normal (homoscedasticidade), e pode ser avaliada pelo teste de ajuste do modelo, pela observação do gráfico de resíduos *versus* concentração (SINGTOROJ; TARNING; ANNERBERG; 2006).

Se um modelo linear demonstra falta de ajuste, devem-se considerar opções como: estabelecimento de um novo intervalo de trabalho (geralmente exclui-se a concentração mais alta) gerando um novo modelo de regressão linear que deverá ser testado quanto às variâncias; ajuste de um modelo quadrático para o mesmo conjunto de valores, avaliando-se de novo o ajuste; ou ainda, o uso de um fator peso (método utilizado para contornar a heteroscedasticidade) aplicando-se um modelo de regressão ponderado, o qual dá maior importância para dados com baixa variância e menor importância para dados com alta variância. Valores empíricos como $1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$ e $1/y^{1/2}$ são usados como pesos (w_i), assim, calcula-se para cada valor de w_i novos valores de coeficientes de regressão (a e b), e avalia-se depois qual dos pesos forneceu um modelo linear com melhor ajuste, calculando-se a percentagem de erro relativo individual e escolhendo o peso correspondente ao menor valor (CASSIANO, 2009).

A análise de linearidade das amostras de warifteína extraídas de plasma de rato demonstrou que o método apresenta-se linear na faixa de concentração entre 10 e 500 ng/mL, havendo supressão do sinal (queda nos valores do PI) para as concentrações de 700 e 1000 ng/mL (Tabela 10). O método foi avaliado estatisticamente, obtendo-se um coeficiente de correlação (r) de 0,998070, e o ajuste do modelo linear foi realizado aplicando-se um modelo de regressão ponderado com valores de peso $1/x^2$ (Figura 57). Dessa forma, o método apresenta-se dentro dos parâmetros de regulação exigidos para a aceitação do mesmo.

Figura 57 – Gráficos de resíduos e de concentração versus resposta de warifteína para a faixa de concentração de linearidade de amostras extraídas de plasma de rato

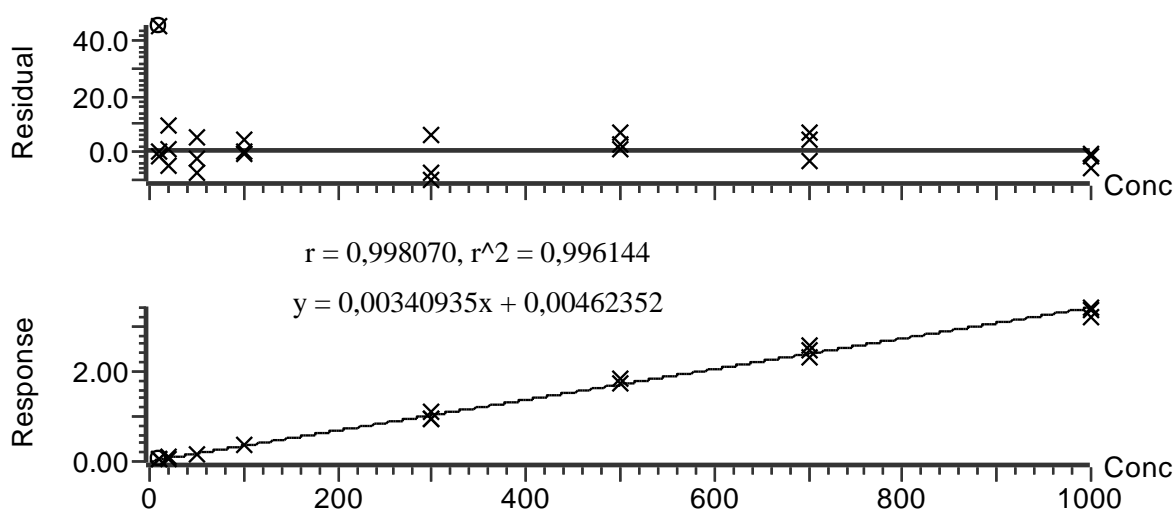


Tabela 10 – Áreas para a warifteína e PI referentes à faixa de concentração para linearidade

Concentração nominal (ng/mL)	Area de WAR	Area do PI
10	927,877	41002,844
	1014,077	41471,277
	885,047	42323,363
20	1519,009	42986,082
	1597,637	41470,270
	1602,897	42174,918
50	3967,937	42323,211
	4457,843	43011,734
	4165,845	43383,895
100	8000,610	39854,664
	7641,656	42279,336
	7754,647	42977,363
300	20310,848	43241,801
	22322,447	42235,789
	21739,225	43825,637
500	37826,059	40452,672
	36157,523	40633,125
	35710,223	39027,340
700	52405,852	23775,424
	51455,699	24975,709
	49508,652	27284,842
1000	71665,984	25490,547
	76274,297	26678,521
	80152,773	27413,131

17 Efeito matriz

O efeito matriz para o método de análise da warifteína em matriz biológica (sangue/plasma) de rato foi avaliado neste trabalho utilizando-se a técnica de infusão pós-coluna. Inicialmente, esse efeito foi avaliado na matriz biológica de sangue, visto que a extração do analito warifteína, quando o padrão proposto era a metil-warifteína, foi realizada em sangue de rato. Para tanto, injetaram-se amostras de branco de sangue (sangue extraído sem warifteína e sem PI), e de warifteína em solução, sendo possível observar uma supressão do sinal no tempo de retenção esperado para a warifteína (Figura 58). Uma tentativa de reduzir o efeito matriz avaliou uma amostra teste com a utilização de cartão de coleta de amostra do tipo *Dry Blood Spot*, sendo observada uma redução do efeito matriz, porém, não foi possível obter recuperação do analito (Figura 59).

Figura 58 – Espectro de avaliação de efeito matriz warifteína em amostra biológica de sangue de rato em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₁₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).

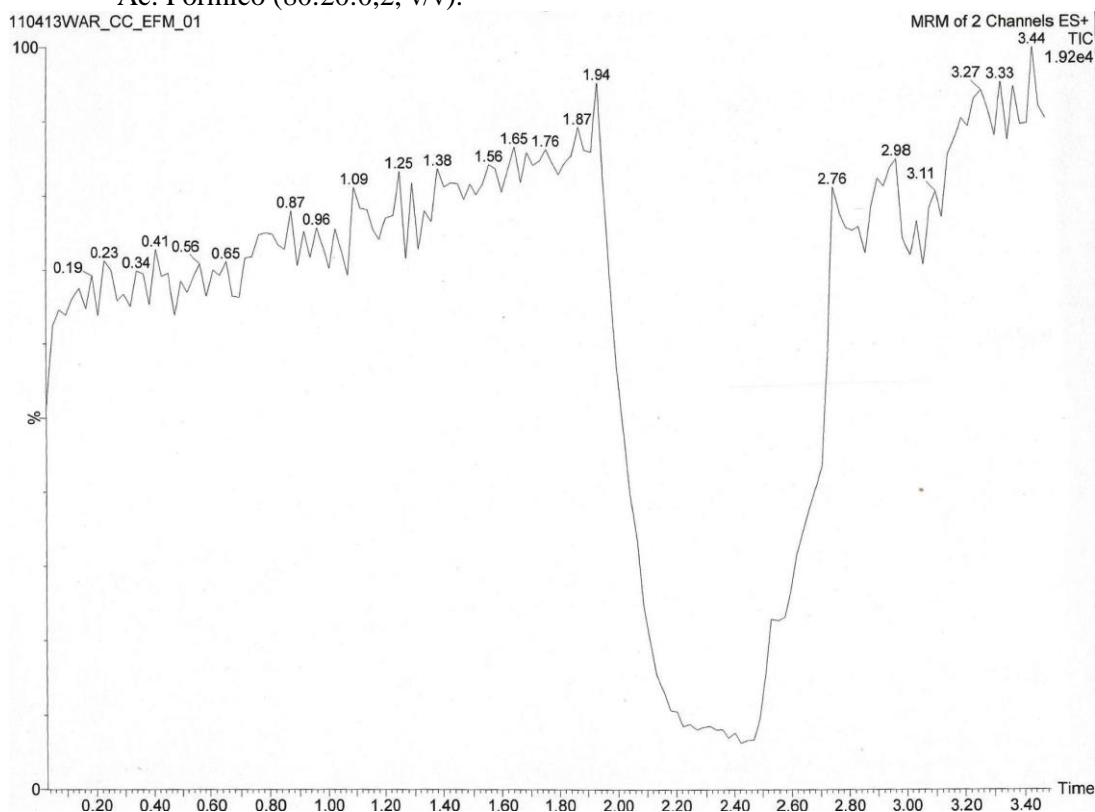
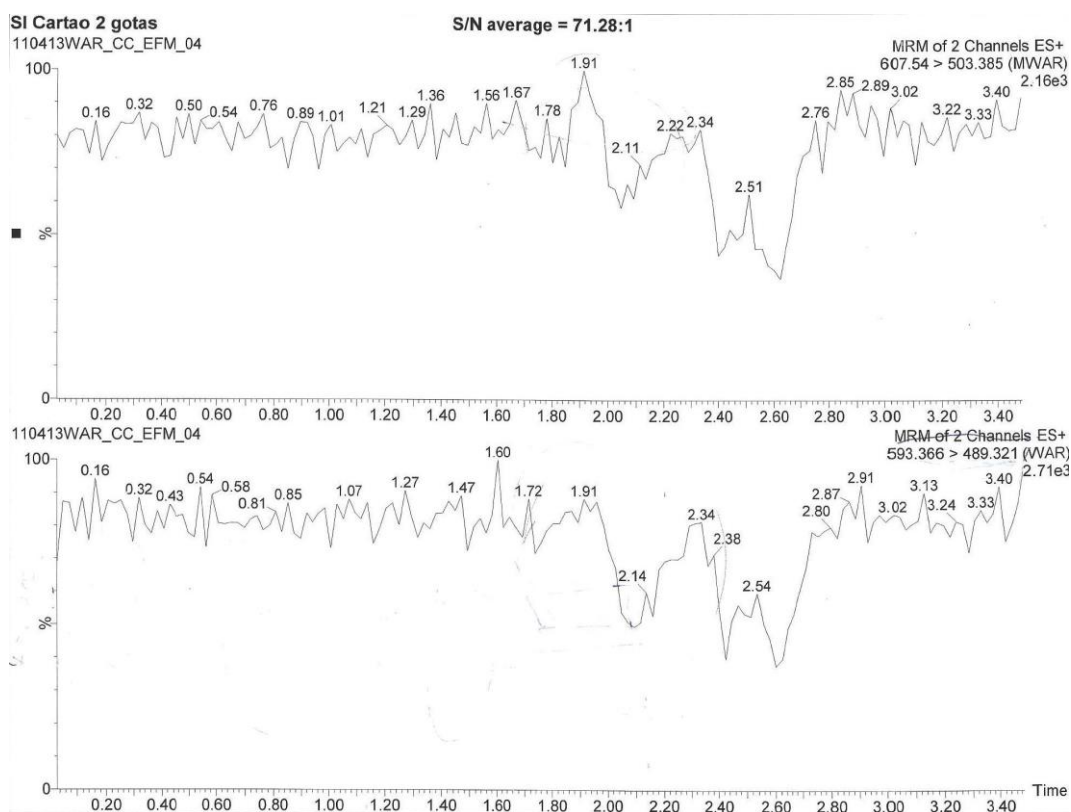


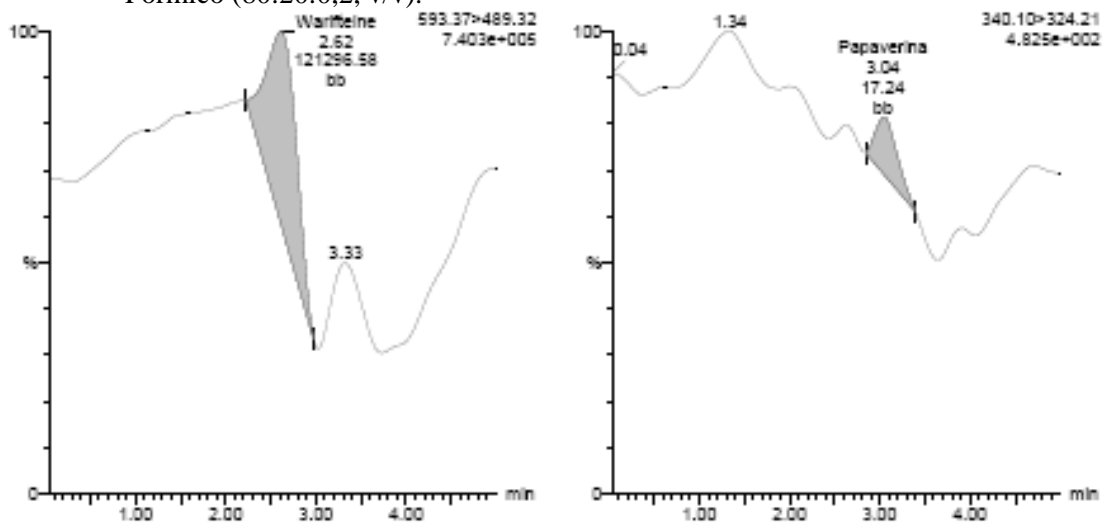
Figura 59 – Espectro de avaliação de efeito matriz warifteína em amostra biológica de sangue de rato extraído em cartão *Dry Blood Spot*, em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₁₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Uma vez determinado que a papaverina seria o padrão interno, novamente avaliou-se o efeito matriz, mas optou-se por realizar a extração da warifteína em matriz biológica de plasma de rato, pois é uma matriz mais limpa e que gera menos interferentes na análise. Assim, nova análise usando a infusão pós-coluna foi realizada considerando a warifteína e a papaverina (Figura 60) como analitos e a extração em matriz de plasma. Os resultados ainda demonstraram um efeito de matriz presente, porém, este se apresentou como uma supressão de sinal menos intensa se comparada à matriz anterior (sangue).

É a competição entre o analito e os componentes não voláteis da matriz que resulta no efeito de matriz, devido à transferência de elétrons do capilar para a solução, e a separação de cargas na superfície das gotas que dão origem aos íons da fase gasosa. O ambiente em que ocorre a ionização e evaporação pode levar a uma supressão ou a um aumento da eficiência de formação dos íons do analito de interesse. Embora esse efeito esteja presente na análise, o mesmo pode ser minimizado através do método de extração e do uso do PI (KING; BONFIGLIO; FERNANDEZ-METZLER; *et al.*, 2000).

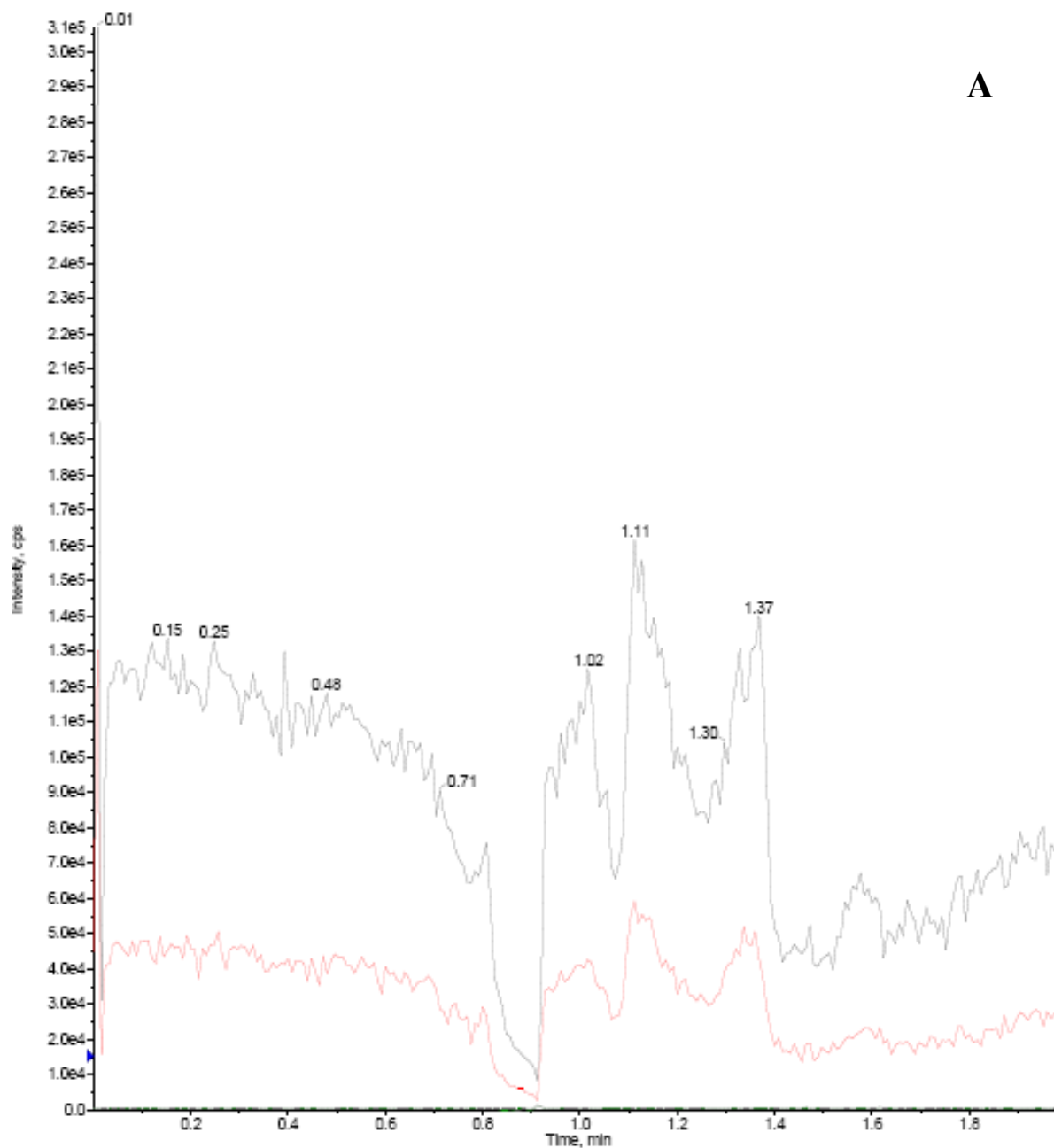
Figura 60 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos, em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



Melhorias nos procedimentos de limpeza da amostra podem remover componentes interferentes da matriz, uma alternativa também é a diluição da amostra, reduzindo-se assim, a quantidade de matriz injetada na coluna cromatográfica e com isso a supressão iônica (QU; WANG; LUO, 2001; BURRMAN; PRICE; RUDEWICZ, 1996).

Algumas tentativas de diminuição do efeito matriz nas análises foram feitas procedendo-se outras formas de extração da warifteína. Dessa vez, utilizando-se extrações líquido-líquido com os solventes: clorofórmio, MTBE e hexano, e também avaliando-se dois tempos de extração (10 e 15 minutos). Podemos observar nas figuras de 61, 62 e 63 as análises realizadas com os diferentes solventes, nos dois tempos de extração. O efeito matriz ainda mostrou-se presente nas extrações realizadas, não havendo melhora independente do tempo de extração avaliado.

Figura 61 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com hexano 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



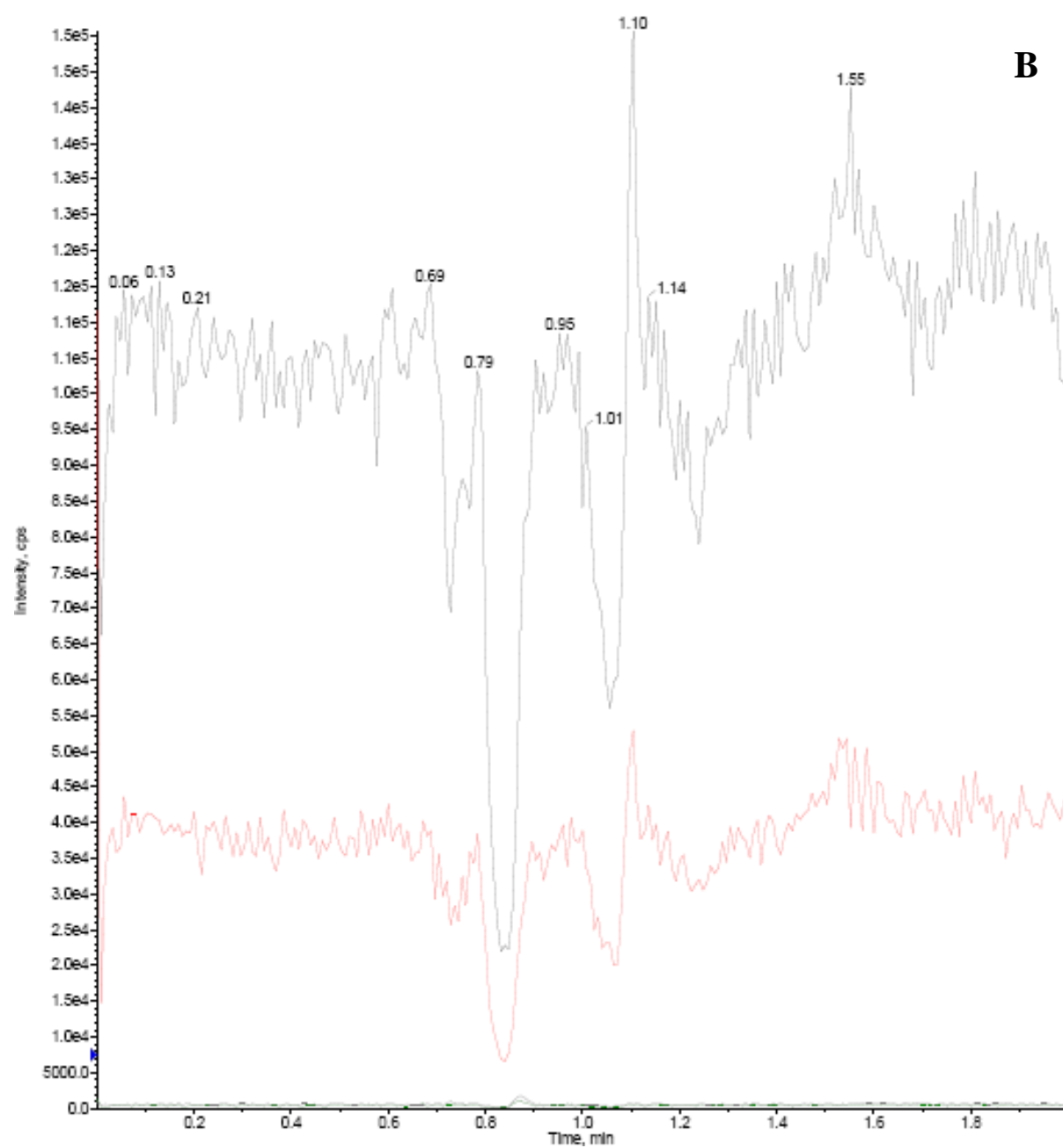
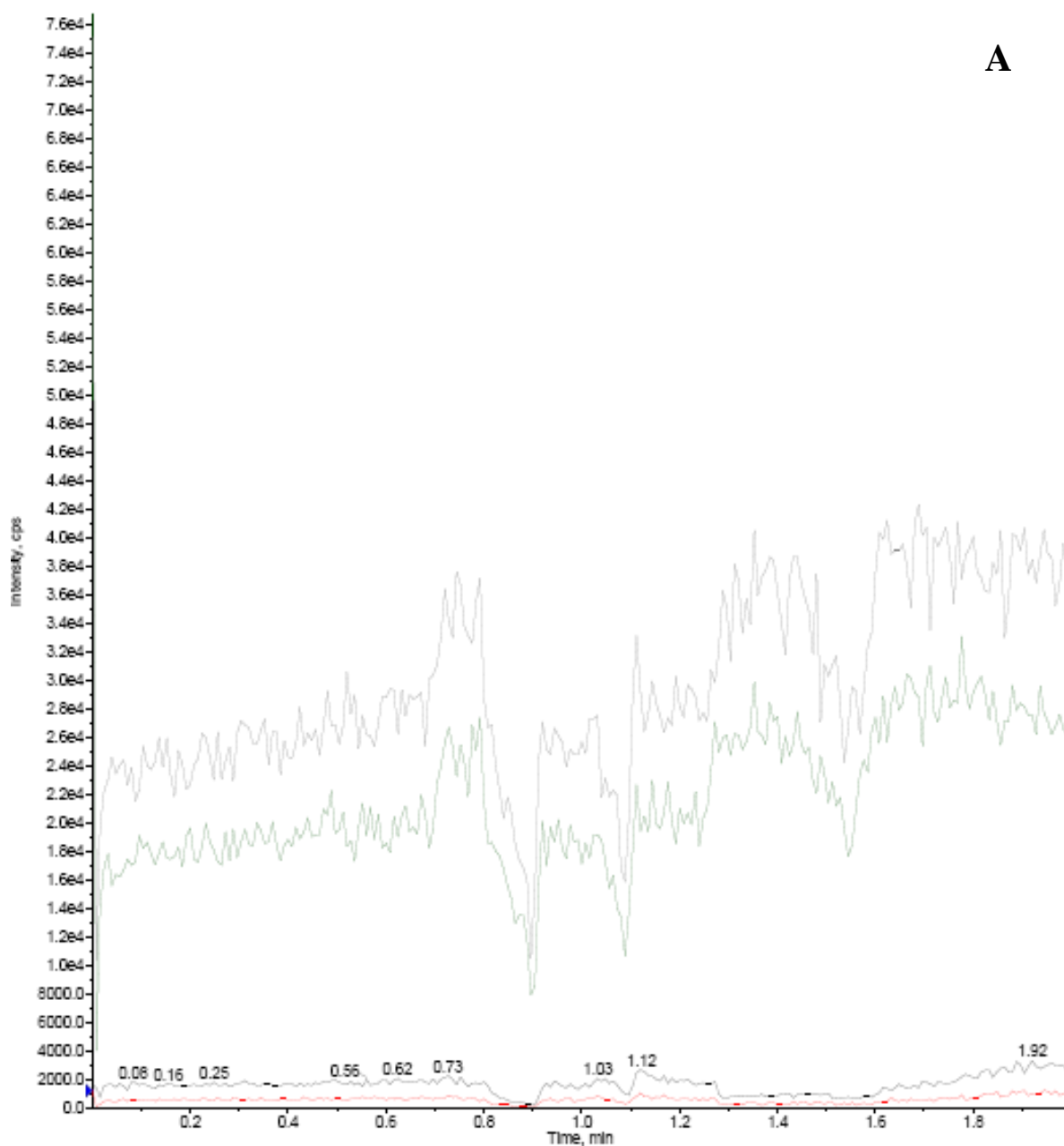


Figura 62 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com clorofórmio 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



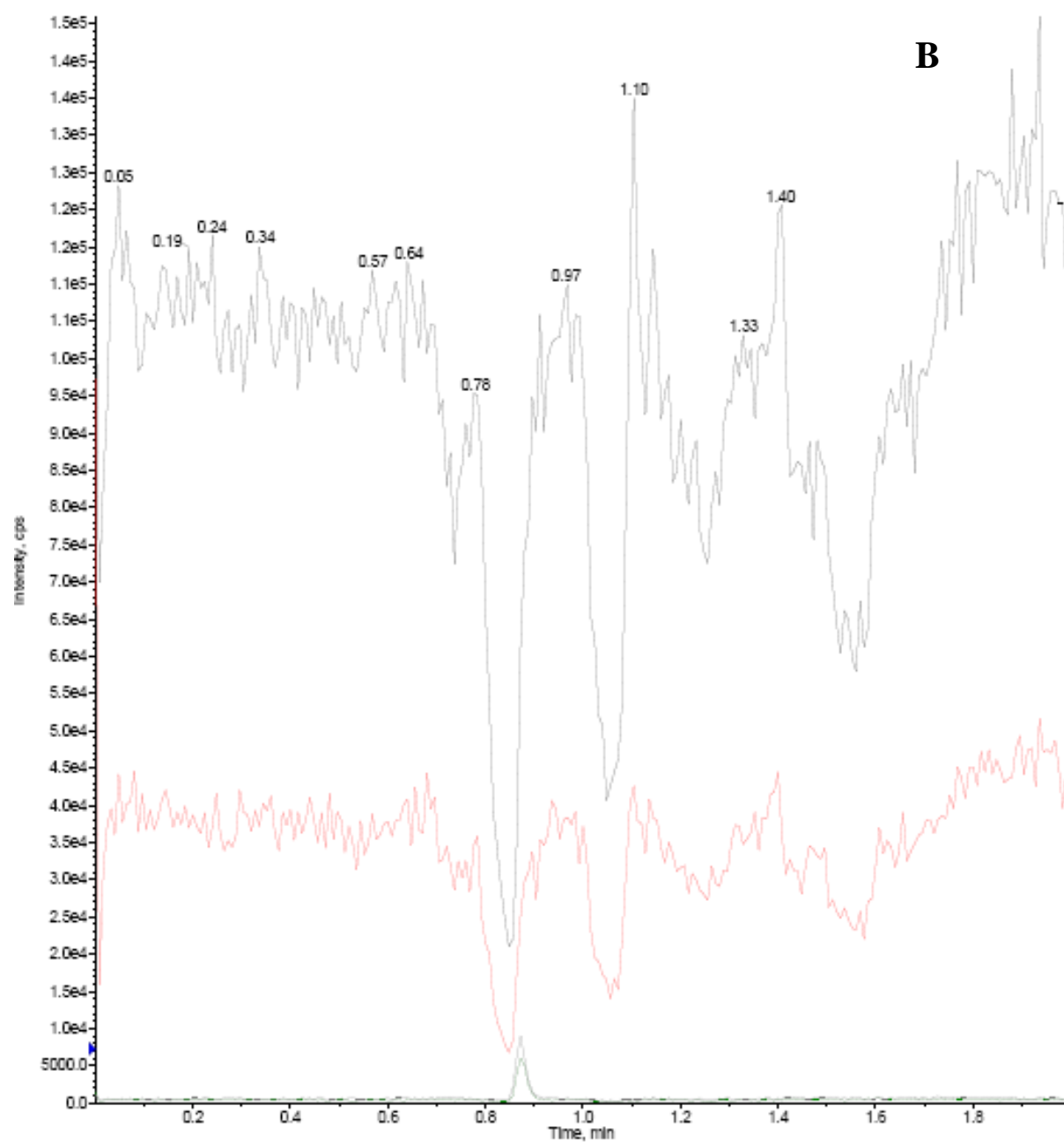
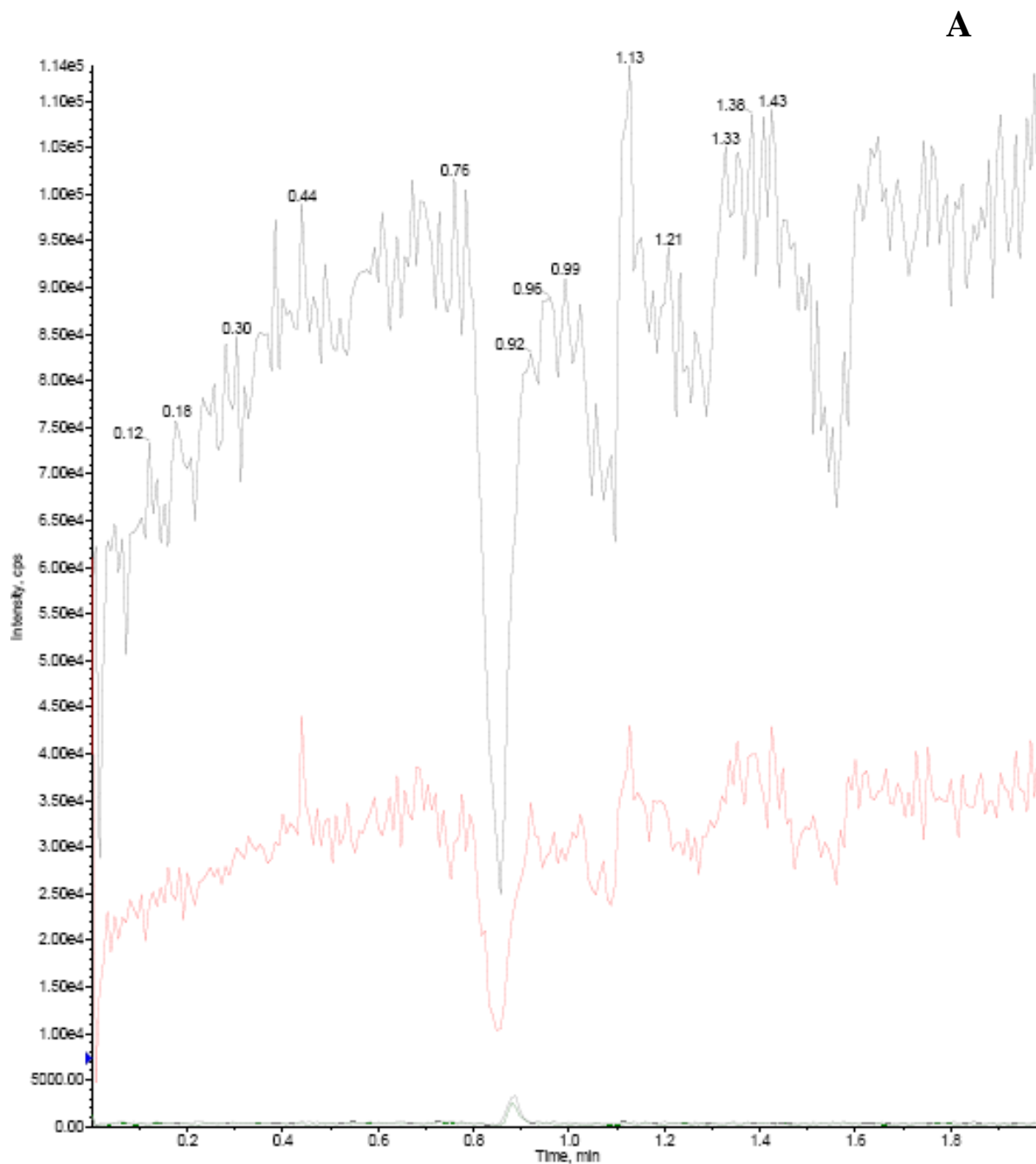
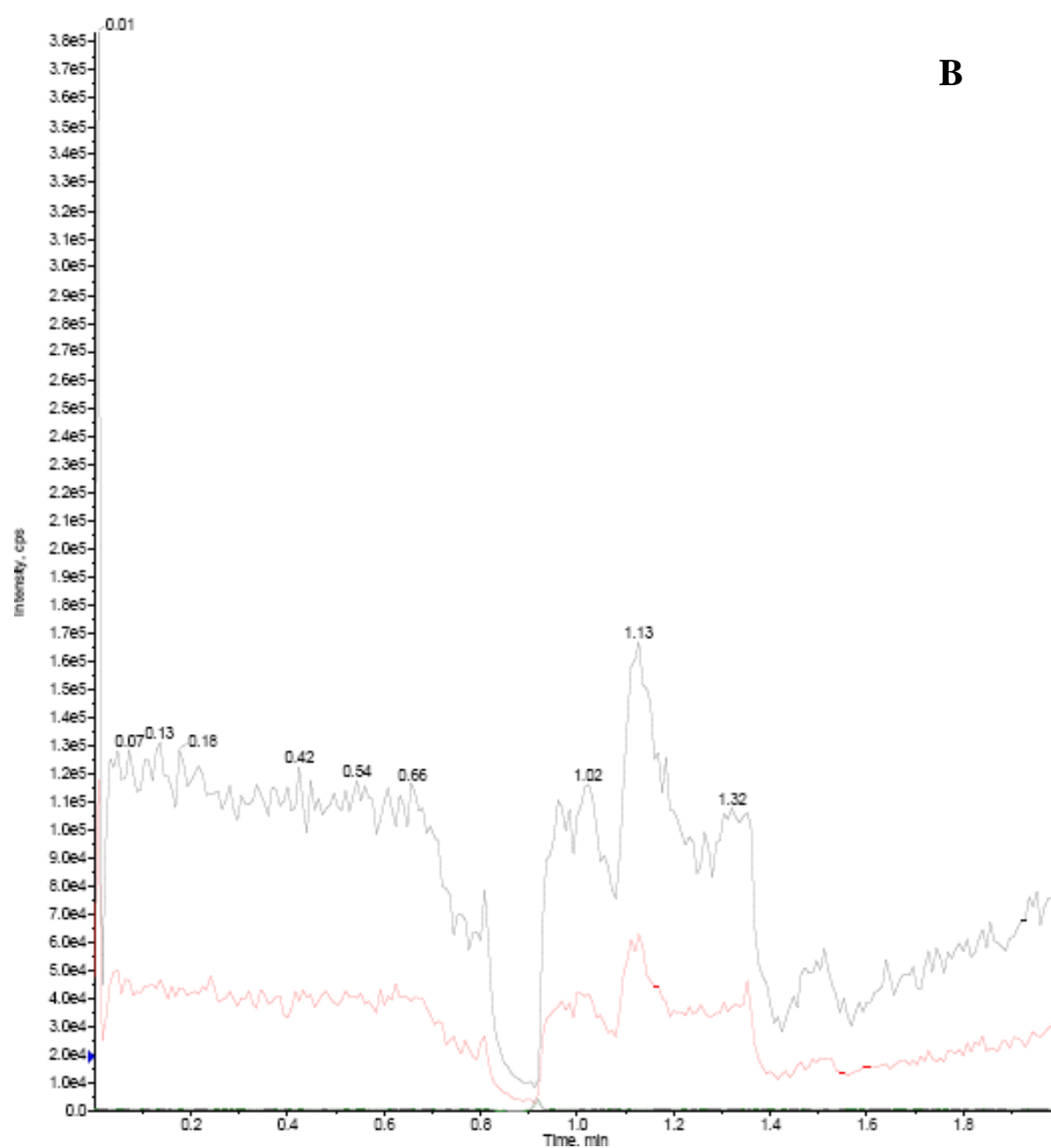


Figura 63 – Cromatograma de avaliação de efeito matriz em matriz biológica de plasma de ratos por ELL com MTBE 10 e 15 min, (A e B, respectivamente) em sistema CLAE-EM, com coluna de fase reversa C₈, fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).



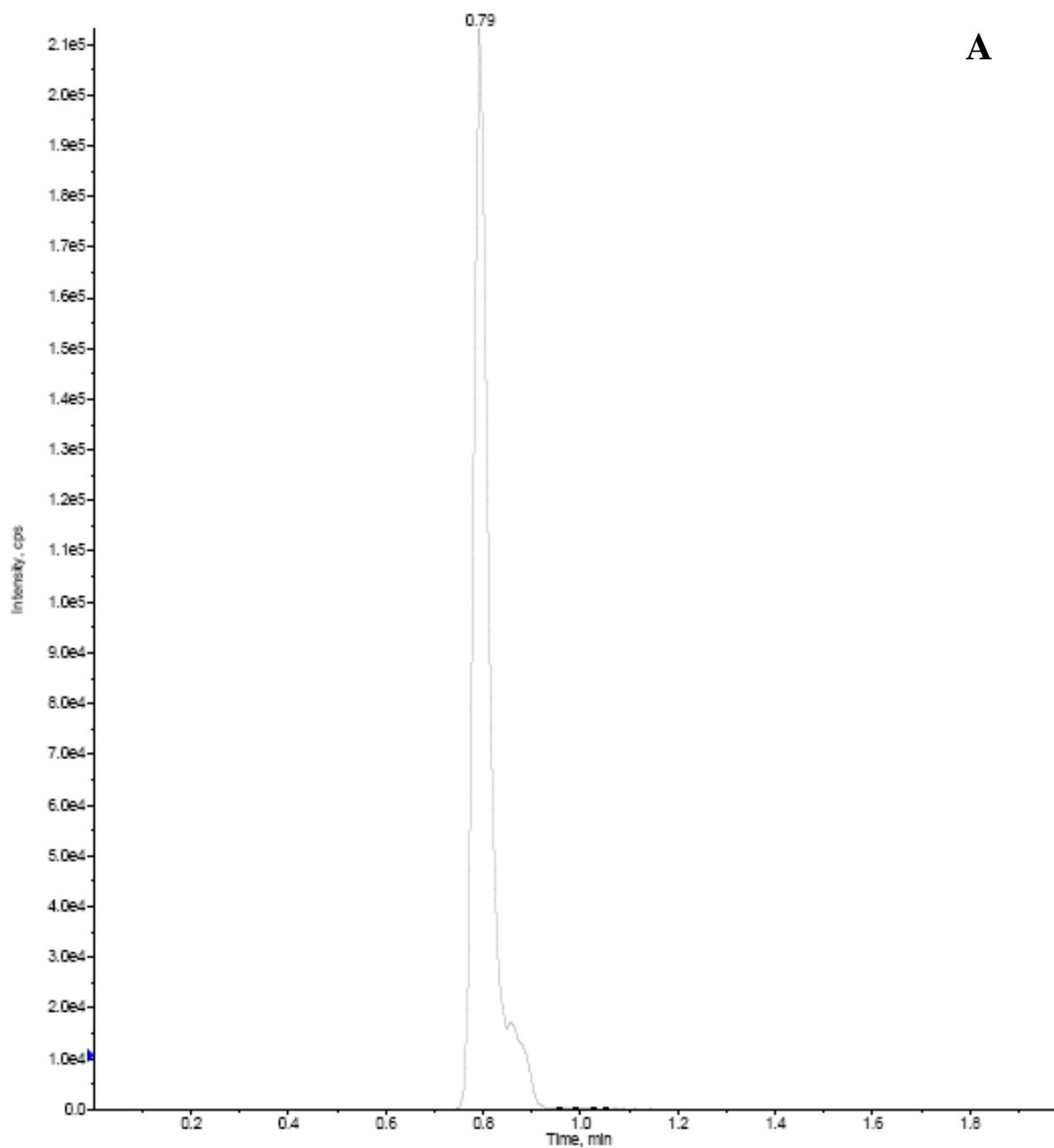
B

Uma alternativa para tentar reduzir a supressão iônica é a resolução cromatográfica dos componentes que coeluem com o analito e/ou padrão interno possibilitando aumentar o tempo de análise (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 1998).

Análises cromatográficas alterando-se a proporção de fase móvel foram realizadas para verificar o efeito matriz. Utilizando-se acetonitrila e água como fase móvel, foram testadas proporções de 60:40; 70:30 e 80:20 para os solventes citados, respectivamente. Variou-se também a coluna cromatográfica, utilizando-se uma C₈ e também uma C₁₈, com as mesmas constituições e proporções de solventes. Podem-se observar esses resultados nas figuras a seguir Figuras 64 e 65.

Os testes com diferentes proporções de fase móvel de acetonitrila e água com ácido fórmico não proporcionaram alterações favoráveis à diminuição do efeito matriz. Não houve nenhuma alteração significativa do pico ou de seu tempo de retenção, assim, permaneceu-se com a condição de fase móvel na proporção de 80:20.

Figura 64 – Cromatograma de injeção de warifteína na concentração de 200 ng/mL preparada com a mesma fase móvel de injeção (acetonitrila e água na proporção de 60:40, respectivamente) em sistema CLAE-EM/EM, com coluna de fase reversa C₈ e C₁₈ (A e B, respectivamente), fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (60:40:0,2, v/v).



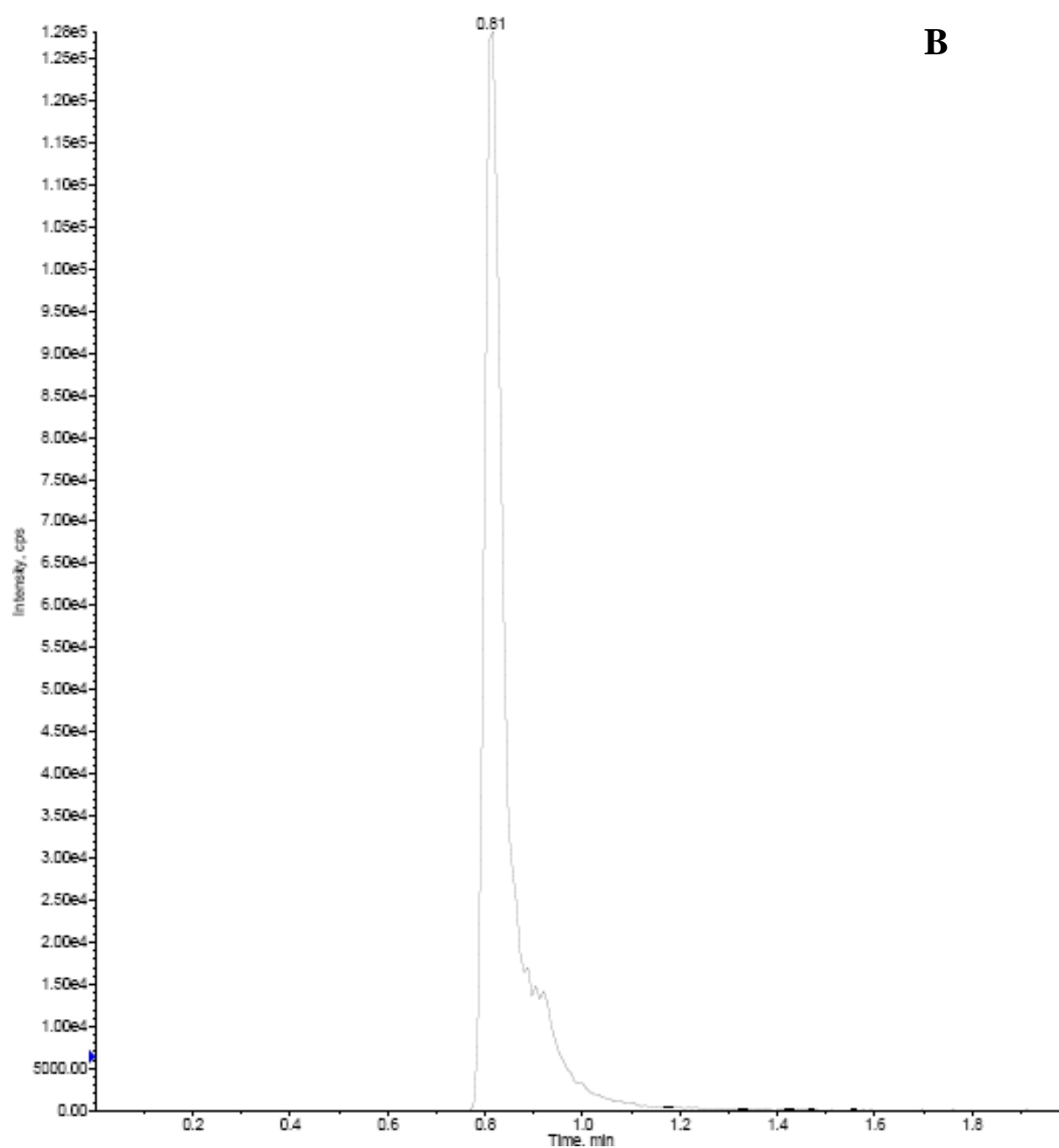
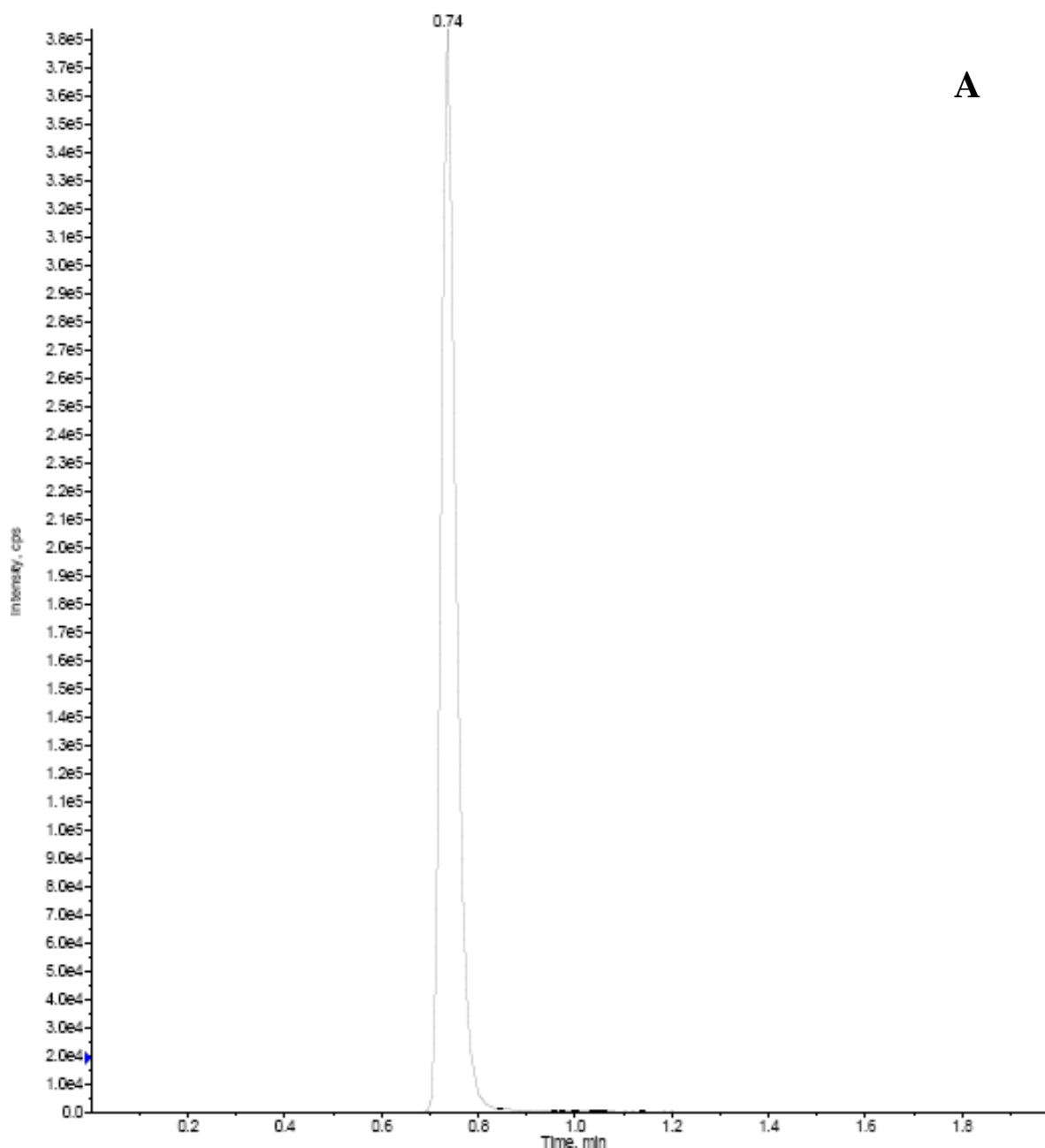
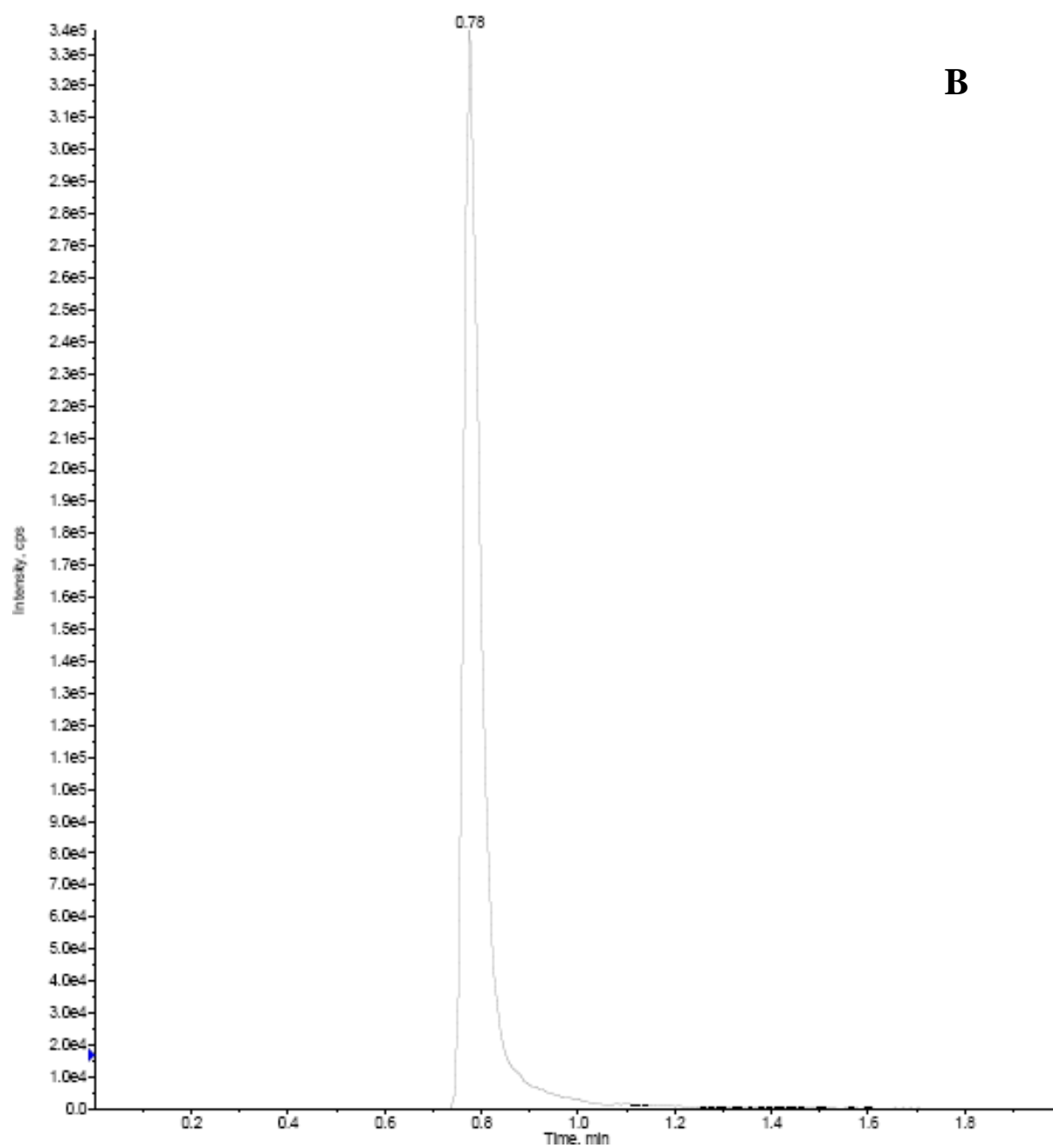


Figura 65 – Cromatograma de injeção de warifteína na concentração de 200 ng/mL preparada com a mesma fase móvel de injeção (acetonitrila e água na proporção de 80:20, respectivamente) em sistema CLAE-EM/EM, com coluna de fase reversa C₈ e C₁₈ (A e B, respectivamente), fase móvel ACN:H₂O: Ác. Fórmico (80:20:0,2, v/v).





18 Administração de warifteína em ratos e aplicação do método de extração para avaliação da farmacocinética

A warifteína foi avaliada quanto à sua farmacocinética após a administração intravenosa em dose única. A escolha da dose para uso nos animais partiu da avaliação de estudos anteriores do grupo de pesquisa em imunologia da professora Dra. Márcia Regina Piuvezam da PgPNSB com o alcaloide warifteína. Em trabalho publicado, o referido grupo avaliou o efeito terapêutico do extrato de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e de seu alcaloide isolado, warifteína, em modelos de hiperreatividade alérgica e asma, em roedores da linhagem murine na administração oral tanto do extrato, quanto do alcaloide isolado na dose de 2,0 mg/Kg (BEZERRA-SANTOS, 2012; COSTA, 2008; BEZERRA-SANTOS, 2006). Em nosso estudo, optamos pela administração do alcaloide isolado pela via intravenosa, dessa forma, utilizamos uma dose menor que a referida no estudo, que foi de 1,0 mg/Kg.

Após a coleta do grupo de animais que recebeu a dose de warifteína intravenosamente, e posterior análise CLAE-EM/EM foram obtidos os perfis de concentração sérica em relação aos tempos individuais, e esses dados foram analisados pela abordagem não compartimental.

As amostras coletadas de sangue de ratos que receberam a warifteína, foram extraídas de acordo com a metodologia descrita no item 13.5.3. Após a extração por precipitação de proteínas com acetonitrila retirou-se das amostras de cada um dos tempos analisados (5, 15, 30, 60, 120 e 180 min) uma alíquota de 250 µL para tubos limpos e adicionou-se um volume de 750 µL de fase móvel (acetonitrila:água/80:20), agitou-se em vórtex por 30 segundos, em seguida, transferiu-se 230 µL para tubos limpos e procedeu-se à injeção no sistema CLAE-EM/EM.

Como este é o primeiro estudo a respeito da biodisponibilidade de warifteína em ratos, no método de quantificação apresentado neste trabalho buscou-se identificar a menor concentração possível de ser quantificada em plasma de rato, sendo encontrado o limite de detecção em 1,0 ng/mL. As análises de amostras coletadas de sangue de ratos permitiram a leitura em níveis de µg/mL, possibilitando trabalhar com uma curva de calibração na faixa de 0,1 a 40 µg/mL.

Um estudo com os alcaloides da Ayahuasca também mostrou um método de detecção e quantificação de harmina, harmalina, tetrahydroharmina extraídas por

precipitação de proteínas, com limite de detecção inferiores a 2 ng/mL (OLIVEIRA, 2012; CALLAWAY, 1996). Um limite de detecção de 10 ng/L foi obtido em estudo com alcaloide vincristina em marsupiais (PHALEN, 2013).

A figura 66 mostra o gráfico da concentração plasmática média de warifteína em $\mu\text{g/mL}$ em função do tempo em minutos após a administração do alcaloide em ratos de acordo com os tempos analisados no protocolo experimental. O melhor modelo para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos da warifteína foi o não compartimental, que considera a permanência de uma substância no organismo expressa em termos do parâmetro área sob a curva (ASC) de concentrações plasmáticas da substância versus o tempo. Foi possível detectar concentrações de warifteína em plasma de ratos da ordem de $6,971 \mu\text{g/mL} \pm 6,01$ (média \pm DP), valor este superior ao limite de detecção do método. Houve, porém, grande variabilidade inter-individual do perfil farmacocinético entre os ratos utilizados no experimento de perfil cinético.

A concentração máxima observada para a warifteína foi de $16,08 \mu\text{g/mL}$ correspondente a 1,6 % da dose administrada ($1,0 \text{ mg/mL}$), num tempo máximo de 12,5 minutos, e após três horas de administração do alcaloide já foi possível observar níveis plasmáticos próximos à linha de base ($0,3610 \mu\text{g/mL} \pm 0,60$). Como a biodisponibilidade intravenosa é de 100 %, é provável que haja uma redistribuição e metabolização do alcaloide, levando a uma diminuição de seus níveis plasmáticos rapidamente ($K_{el} = 0,01355 \text{ min}^{-1}$). Os parâmetros farmacocinéticos avaliados a partir da administração por via intravenosa podem ser observados na tabela 10.

Figura 66 – Gráfico de concentração plasmática média ($\mu\text{g/mL}$) em função do tempo (minutos) de warifteína administrada na dose de 1,0 mg/Kg em ratos por via intravenosa (cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 animais)

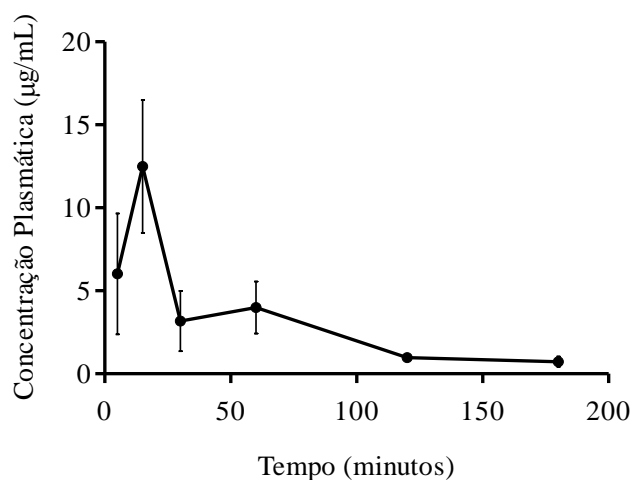


Tabela 10 – Parâmetros farmacocinéticos para warifteína administrada intravenosamente em ratos

Parâmetro farmacocinético	Valor médio (n = 4)	IC _{95%}
ASC _{0-Tfinal} ($\mu\text{g/mL.h}$)	532,8	235,0 – 830,6
ASC _{0-∞} ($\mu\text{g/mL.h}$)	625,2	255,0 – 995,4
C _{máx} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	16,08	9,24 – 22,91
T _{máx} (min^{-1})	12,5	4,54 – 20,46
Kel (min^{-1})	0,01355	-0,0002589 – 0,02736

ASC_{0-Tfinal} = área sob a curva do tempo zero ao último tempo com concentrações mensuráveis; ASC_{0-∞} = área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito; C_{máx} = máxima concentração plasmática; T_{máx} = tempo referente à máxima concentração de substância em plasma.

Para o método desenvolvido no presente estudo, foi possível a quantificação de warifteína em níveis mais elevados do que o limite de detecção obtido, sendo possível o trabalho com amostras em níveis de concentrações mais elevados. Também foi possível obter medidas plasmáticas de warifteína em todos os tempos avaliados para todos os animais. Porém, observou-se grande variabilidade entre as concentrações plasmáticas dos animais após administração de dose única de warifteína nos ratos utilizados nos experimentos.

Um estudo com o alcaloide vincristina também apresentou consideráveis variações intra e inter-animais entre as concentrações plasmáticas do alcaloide em experimento de farmacocinética com marsupiais da família Dasyuridae após administração de dose única do alcaloide (PHALEN, 2013).

A determinação de parâmetros cinéticos para a warifteína é fundamental, visto seu uso popular e a caracterização de sua ação principalmente do ponto de vista

antiinflamatório, e em modelos de hiperreatividade alérgica, tornando possível a partir disso, a avaliação de sua biodisponibilidade relativa frente formulações que mimetizem seu uso popular. Isto permitirá avanços nos estudos de futuras formulações e melhor caracterização da ação da substância.

19 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A separação cromatográfica preparativa através de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência permitiu o isolamento, além da warifteína e da metil-warifteína, da mistura de epímeros desmetil-roraimina e epi-desmetil-roraimina, e ainda de dois alcaloides, dos quais um deles é inédito na literatura e teve sua estrutura elucidada sendo denominado de Sousina, e outro que se encontra em fase de elucidação estrutural.
- ✓ O método bioanalítico desenvolvido permite a detecção da warifteína em plasma de rato a um nível de concentração de até 1ng/mL utilizando o modo de detecção MRM.
- ✓ A metil-warifteína não se mostrou um padrão interno apropriado devido a efeitos de *crosstalk* em relação à detecção da warifteína.
- ✓ A papaverina foi utilizada com sucesso como padrão interno da warifteína.
- ✓ A detecção da warifteína mostrou-se linear na faixa compreendida entre 10 e 500 ng/mL.
- ✓ O método proposto por CLAE-EM/EM permitiu quantificar a warifteína em fluido plasmático de rato com a extração das amostras por precipitação de proteínas.
- ✓ Os parâmetros farmacocinéticos determinados para a warifteína em administração via intravenosa em ratos mostraram elevada variabilidade interindividual.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. L., C. G. F.; TRINDADE, M. N.; NETO, H. C. C. F.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. (2003). *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. *Braz J Med Biol Res* 36(2): 199-205.
- ALMEIDA, R. N.; MELO-DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A.; QUINTANS, L. J.; NAVARRO, D. S.; FALCÃO, A.; DUARTE, J. C.; BARBOSA, J. M. (2005). Anorectic and behavioural effects of chronic *Cissampelos sympodialis* treatment in female and male rats. *Phytother Res* 19: 121-124.
- ALMEIDA, R. N. N., D. S.; DE ASSIS, T. S.; DE MEDEIROS, I. A.; THOMAS, G. (1998). Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* 63(3): 247-252.
- ALENCAR, J. L. (1994). Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Programa de Pósgraduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **In:** Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba, Brazil.
- AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY - ASMS. Visualizado em : <http://www.asms.org/publications/history/about-asms-and-ms-history>. 2013
- ANOVÁ, C. M.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 797, n. 1-2, p. 91-109, 2003.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, Jr.; LOYD, V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009
- ARAGÃO, C. F. S. S., F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, R. O. (2002). Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12(60-61).
- ARAGÃO, C. F. S. F., J. M. B.; MACÊDO, R. O. (2001). Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSC photovisual system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 64(1): 185-191.
- ARDREY, 2003 *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. Robert E. Ardrey Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd. ISBNs: 0-471-49799-1 (HB); 0-471-49801-7 (PB).

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. (1997). Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *J. Braz. Assoc. Advanc. Sci.* 49: 386-394

BEZERRA-SANTOS, C. R. A., A. V.; VIEIRA, G. C.; FILHO, J. R.; BARBOSA, J. M.; MELO, C. B.; PIRES, A. L.; MARTINS, M. A.; SOUZA, H. S.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. (2012). Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. *International Immunopharmacology* 13(2): 148–155.

BEZERRA-SANTOS, C. R. A., A. V.; BARBOSA, J. M.; MELO, C. B.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. (2006). Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *International Immunopharmacology* 6(7): 1152-1160.

BOONE, C. M.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W. J. M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs—a review. *J Pharma and Biomed Anal*, v.20, p. 831-63, 1999.

BORKAKOTI, N. P., R. A. (1978). The structure of the bisbenzylisoquinoline alkaloid dimethylwarifteine. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 34(2): 482-489.

BOULET, M.; BRITTEN, M.; LAMARCHE, F. Dispersion of food proteins in wateralcohol mixed dispersants. *Food chemistry*, v. 74, n. 1, p. 69-74, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, v.. 32, n. 4, 1021-1030, 2009.

CAVALCANTE, H. M. M. R., T. P.; SILVA, D. F.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; CORREIA, N. A.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. (2011). Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14-Dihydromorphinandienone Alkaloid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 108(2): 122-130.

CERQUEIRA-LIMA, A. T. A.-N., N. M.; DE CARVALHO, L. C.; COSTA, R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOMTCHILLO, R. B.; OLIVEIRA, E. J.; MARINHO, A. F.; FIGUEIREDO, C. A. (2010). Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Curr Drug Targets* 11(11): 1458-1467.

CHANG, M. S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOURBAGY, T. A. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: Pros and Cons. *Drug Development Research*, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

CHENG, P. M., Y-B; YAO, S-Y; ZHANG, Q.; WANG, E-J; YAN, M-H; ZHANG, X-M; ZHANG, F-X; CHEN, J-J. (2007). Two new alkaloids and active anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 5316-5320.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimento. *Quím. Nova*, v. 31, N. 3, 623-636, 2008.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CORTES, S. F. D. A., J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. (1995). Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). *Phytotherapy Research* 9(8): 579-583.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1984. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, IBDF / RJ.

COSTA, E. V. P., M. L. B.; SOUZA, A. D. L. de; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. (2011). Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules* 16 (11): 9714-9720.

COSTA, H. F. B. S., C. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARTINS, M. A.; PIUVEZAM, M. R. (2008). Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. *International Immunopharmacology* 8 (4): 519-525.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nova*, v. 29, n. 2, 287-292, 2006

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUESENDRA, J. M.; Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *Trends Anal. Chem.* 2001, 20, 620.

DAMEN, C. W.; ROSING, H.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. Application of dried blood spots combined with high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of vincristine and actinomycin-D. *Anal and Bioanal Chem* 2009; 394(4): 1171-1182.

DE FREITAS, M. R. C., S. F.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. (1996). Modification of Ca^{2+} metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *J Pharm Pharmacol* 48(3): 332-336.

DE FREITAS, M. R. (1994). Alcalóides isolados das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.. In: Programa de Pós graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa

DE HOFFMAN, E.; CHARETTE J.; STROOBANT, W. Book Review: Mass Spectrometry: Principles and Applications. Wiley: Chichester 1996. ISBN 0 471 96697 5

DE LIRA, G. A. D. A., L. M.; FLORÊNCIO, K. C.; DA SILVA, M. S.; BARBOSA, J. M.; DE-CUNHA, E. V. L. (2002). Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. *Fitoterapia* 73(4): 356-358.

DINIZ, M. F. F. M. (2000). Ensaios toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). Tese: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

DINIZ, M. F. F.; et al.. Ensaios pré-clínicos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **In:** SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE FARMACÊUTICOS, 1, 1995, São Paulo. Resumo. São Paulo: USP, 1995. p. 27, PM 108.

EICHLER, A. W. (1887). Flora Brasilienses.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. *Quím Nov* 21(1) (1998)

FEITOSA, E. M. A. (2009). Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(2): 375-378.

FELGINES, C.; TALAVÉRA, S.; GONTHIER, M. P.; TEXIER, O.; SCALBERT, A.; LAMAISSON, J. L.; RÉMÉSY, C. (2003): Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 133: 1296-1301.

FINEHOUT, E. J. L., K. H. (2004). An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research. *Biochemistry and molecular biology education* 32(2): 93-100.

FONSECA, F.V.; FIGUEIRÊDO, C. A. (1999). Aspectos agronômicos da *Cissampelos sympodialis* Eichl. Nota técnica, pp. 3. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

FREITAS, M. R.; LEMOS, V. S.; QUEIROGA, C. E. G.; THOMAS, G.; MEDEIROS, I. A.; CORTES, S. F. (2000). Mechanisms of the contractile effect of the hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in the rat aorta. *Phytomedicine* 7: 63-67.

GONÇALVES, M. A. L., T. A.; PIMENTA, L. P. S. (2009). Alcaloides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart, Sociedade Brasileira de Química.

GORINSKY, C. L., D. K.; NICHOLLS, P. J. (1972). Neuromuscular blocking and local anaesthetic activities of warifteine hydrochloride, an alkaloid isolated from *Cissampelos ovalifolia* D. C. *J. Pharm. Pharmac.* 24 (Suppl.): 147P.

HENDRIKS, G. Theoretical models in LC based bioanalytical method development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, n. 1, p. 1 -10, 2009.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.856, n.1-2, Sep 24, p.3-54. 1999.

JACQUES, F. M. B. B., P. (2008). Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Plant Systematics and Evolution* 274(1-2): 83-97.

JUCÁ, M. B. (1998). Inibidores de transcriptase reserva de vírus de mieloblastose de aves.

KAZAKEVICH, Y.; LoBRUTO, R. **In:** HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons. ISBN-13:2007; 937-980.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.40, p.500-8, 2006.

KLEIN, T; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P., Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2009; 30 (3):241-248 ISSN 1808-4532.

KUPCHAN, S. M. P., A. C.; FUJITA, E. (1965). Tumor inhibitors VI. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 54(4): 580–583.

LATIF, Z.; SARKER, S.D. Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC). *Methods Mol Biol.* 2012; 864:255-74.

LARSEN, D. UCDAVIS CHEMWIKI Think outside the book. http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UC_Davis/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_2%3A_High_Performance_Liquid_Chromatography.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. *J. Chromat B*, v. 689, n. 1, p. 221-237, 1997.

LIU, W. Y., Y.; YANG, R.; WAN, C.; XU, B.; CAO, S. (2010). Optimization of Total Flavonoid Compound Extraction from *Gynura medica* Leaf Using Response Surface Methodology and Chemical Composition Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 11(11): 4750–4763.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; Jr. V. F. V. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 25: 429-438.

MACHADO, M. B. L., L. M. X. (2010). Dimeric alkaloids and flavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38(1): 110-115.

MARINHO, A. F. O., E. J.; TAVARES, J. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. (2013). ¹H and ¹³C NMR assignments of two new isomeric bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Magnetic Resonance Chemistry* 51(5): 312-315.

MARINHO, A. F. Caracterização dos marcadores, desenvolvimento e validação de método analítico aplicado ao estudo de sazonalidade e identificação de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis*. Tese de doutorado. UFPB. 2011.

MARTINS JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). *Quim. Nova*, v. 29, n. 3, 586-592, 2006

MCMASTER, M. C. Sample preparation and methods development. **In:** HPLC – A practical user’s guide — John Wiley & Sons - 2007

MEDEIROS, I. A.; PIRES, S. L. S.; ALMEIDA, R. N.; THOMAS, G. (1998). Cardiovascular effects of an aqueous fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl in the rat. *Phytomedicine* 5(2): 97-102.

MELO, P. S. C., H. M. de M.; BARBOSA-FILHI, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; DE MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. (2003). Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicol Lett* 142(1-2): 143-151.

MOELLER, M. R.; KRAEMER, T. Drugs of Abuse Monitoring in Blood for Control of Driving Under the Influence of Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.24, p.210– 21, 2002.

MOELLER, M. R.; STEINMEYER, S.; KRAEME, T. Determination of drugs of abuse in blood. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 713 (1998) 91-109

MUKHERJEE, R. K., P. A. (2003). Warifteine and methylwarifteine: H^1 and C^{13} assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41(3): 213-218.

MUKHTAR, M. R; HADI, A. H. A.; LITAUDON, M.; AWANG, K. (2004). Morphinandienone alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*. *Fitoterapia* 75: 792-794.

MURPHY, C. M.; HUESTIS, M. A. LC–ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3- β -D-glucuronide, morphine-6- β -D-glucuronide, and codeine-6- β -D-glucuronide in human urine. *J. Mass Spectrom.* 2005; 40: 1412–1416.

OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G. Liquid chromatography±mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomed. Chromatogr.* 14: 351–372 (2000)

ORLANDO, R. M.; CORDEIRO, D. D.; MATHIAS, A. E. B.; REZENDE, K. R.; GIL, E. S. Pré-tratamento de amostras. *Vita et Sanitas*, Trindade-Go, n. 03, jan.-dez./2009

PARTICLE SCIENCES. Mass Spectrometry in Bioanalysis. *Technical Brief.* v. 4. 2009

PIUVEZAM, M. R. P., L. M.; ALEXANDER, J.; THOMAS, G. (1999). *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells. *J Ethnopharmacol* 67(1): 93-101.

POLSON, C., SARKAR, P., INCLEDON, B., RAGUVARAN, V., AND GRANT, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 785, 263-275.

PORTO, N. M. B., I. J. L. D.; AGRA, M. de F. (2008). Pharmacobotanical study of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl., (Menispermaceae). *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(1): 102-107.

PORTO, N. M. D. F., R. C. B. Q.; OLIVEIRA, A. F. M.; AGRA, M. F. (2010). Leaf epidermal characteristics of *Cissampelos* L. (Menispermaceae) species from Northeastern Brazil. *Microscopy Research and Technique* 74: 370-376.

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.

RAJENDRAN, A.; PAREDES, G.; MAZZOTTI, M. Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 2004, 27, 771.

SNYDER; KIRKLAND; GLAJEH, Practical HPLC method development. 2nd ed. New York: Wiley, 1997.

STICHER, O. Natural product isolation. *Nat. Prod. Rep.*, 2008, 25, 517–554.

RHODES, D. G. (1975). A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytologia*: 415-484.

SCOTT, R. P. W. Principles and practice of chromatography, Library for science, LLC, 2003.

SHABIR, G. A.: Validation of HPLC Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of FDA, the US Pharmacopeia and the ICH. *J. Chromatogr. A*. 987(1-2); 2003: 57-66.

STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 887– 917

TONHI, E.; COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em

superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quim. Nova*, Vol. 25, n. 4, 616-623, 2002.

THOMAS, G. B., F.; PYNE, S.; PYNE, N. J. (1997). Characterization of an extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea. *Phytotherapy Research* 11(7): 496–499.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, v.902, p.167–94, 2000.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, v. 73, n. 8, pp. 1381–1386, 2001.

VESTAL, M. L. Methods of ion generation. *Chem. Rev.*, 2001, 101 (2), pp 361–376

VÉKEY, K. (2001). Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr. A* 2(921): 227-236.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Dairy chemistry and physics*, New York: John Wiley and Sons, 1984.

XING, J.; XIE, C.; LOU, H. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in natural products analysis. *J Pharm Biom Anal* 44 (2007) 368-378.