

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

ALEXSANDRO FERNANDES MARINHO

CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES,
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO APLICADO AO ESTUDO DE SAZONALIDADE E
IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALCALÓIDES DE *Cissampelos*
sympodialis

JOÃO PESSOA-PB

Dezembro de 2011

ALEXSANDRO FERNANDES MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES,
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO APLICADO AO ESTUDO DE SAZONALIDADE E
IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALCALÓIDES DE *Cissampelos
sympodialis***

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

Área de concentração: Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Jose Maria Barbosa Filho

Segundo orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

**João Pessoa – PB
Dezembro de 2011**

M338c Marinho, Alexsandro Fernandes.

Caracterização dos marcadores, desenvolvimento e validação de método analítico aplicado ao estudo de sazonalidade e identificação de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis*/ Alexsandro Fernandes Marinho. - - João Pessoa: [s.n.], 2011.

192f. : il.

Orientador: José Maria Barbosa Filho e Eduardo de Jesus Oliveira.

Tese (Doutorado) – UFPB /CCS.

1. Produtos naturais. 2. Menispermaceae. 3. Warifteína. 4. Metilwarifteína. 5. Milonina.

UFPB/BC

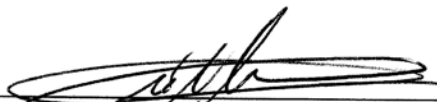
CDU: 547.9(043)

ALEXSANDRO FERNANDES MARINHO

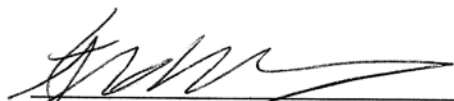
**CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES,
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO APLICADO AO ESTUDO DE
SAZONALIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
ALCALÓIDES DE *Cissampelos sympodialis***

Aprovado em 09/12/2011

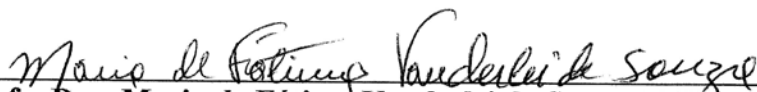
COMISSÃO EXAMINADORA



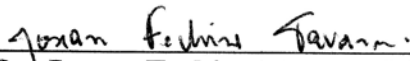
Prof. Dr. Flávio Accioly de Lima e Moura (UFRN) (Membro Externo)



Prof. Dr. Franklin Riet Correa Amaral (UFCG) (Membro Externo)

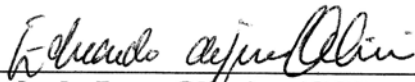


Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza (CCS-UFPB) (Membro Interno)



Prof. Dr. Josean Fechine Tavares (CCS-UFPB) (Membro Interno)

Prof. Dr. Jose Maria Barbosa Filho (CCS-UFPB) (Orientador)



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

DEDICATÓRIA

A Deus em primeiro lugar pela saúde...

A meus pais João Marinho e Ioneide Fernandes

A minha filha Laís Marinho pela paciência, carinho e amor mesmo nos vários momentos de ausência como pai e a minha esposa Carlane pela sua compreensão, apoio, amizade, encorajamento e amor

A meus irmãos Alexandre Fernandes e Alex Fernandes

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pela confiança, incentivo, entusiasmo e orientação nos estudos fitoquímicos e na minha formação acadêmica durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, meu segundo orientador do doutorado e que foi orientador no mestrado pelos seus conhecimentos na execução e orientação dos estudos em CLAE e também na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela elucidação estrutural dos alcaloides inéditos isolados.

Aos Diretores do antigo LTF Prof. Dr. Marcelo Sobral, Prof. Dr. Isac Almeida, Profa. Me. Silvana Jales, pelo incentivo a qualificação e também ao novo diretor do agora Centro de Biotecnologia Prof. Dr. Valdir, também pelo incentivo a qualificação dos funcionários.

A banca examinadora composta pelos professores: Prof. Dr. Túlio Accioly, Prof. Dr. Franklin Riet, Profa. Dra. Fátima Vanderlei, Prof. Dr. Josean Fechine, os meus sinceros agradecimentos por terem aceitado o convite.

A meus amigos e também funcionários Sócrates Golzio dos Santos e Vicente Carlos de Oliveira pelo incentivo, amizade e colaboração com seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela contribuição na minha formação acadêmica e científica.

As secretarias da Pós-Graduação Tânia Maria Alves, Caroline Medeiros Manguiera e Francis Mary Nogueira de Lima pela atenção e eficiência na execução dos documentos necessários durante o curso.

Aos meus amigos e funcionários do CBiotec: Jéferson Macena, Kazuko, Nonato, Wellington, Brizola, Raquel, Francisca, Gilmar, Gilmário, Aloísio, Irene, Célia, Afredo, Severino (Bil), Vanderley, Carlos Santiago, Carlos, Ataíde pela amizade e incentivo.

A todos os meus amigos da minha turma do doutorado e em especial os companheiros de Vôlei de praia: Roosevelt, Rafael, Ataíde, Marcelo, Jose Guedes e Lázaro.

A todos os funcionários da limpeza do Laboratório.

“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e auto-sacrifício, esforço e dúvida”.

Max Beerbohm

RESUMO

O extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl mostrou promissora atividade em diferentes modelos animais de asma. Vários alcaloides têm sido isolados e identificados no extrato, incluindo warifteína e metilwarifteína (bisbenzilisquinolínicos), assim como milonina (morfinandienônico). Nesse trabalho descrevemos o desenvolvimento e validação de método para quantificação simultânea dos marcadores químicos em extratos etanólico aplicado ao estudo da sazonalidade e o isolamento de dois alcalóides bisbenzilisquinolínicos. Os alcalóides milonina, warifteína e metilwarifteína foram isolados, purificados e quantificados em extratos etanólico bruto das folhas através de metodologia desenvolvida e validada. A warifteína e metilwarifteína foram isolados da fração de alcaloides totais das raízes (FAT-r) de *C. sympodialis*, enquanto a milonina foi isolada da FAT-f. A identificação estrutural dos alcaloides foi realizada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas e espectrometria de infravermelho. O método fez uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (278 nm), utilizando uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 μm) e como fase móvel uma mistura de água-trietilamina (0,05%) (A) : metanol (B) em modo gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (80%), 25-30 min. (60%) a um fluxo de 1 mL/min. e tempo de corrida de 30 min. O método cromatográfico desenvolvido foi validado segundo o preconizado na Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e se mostrou linear na faixa de concentração utilizada (2-100 $\mu\text{g/mL}$), seletivo (com boa separação entre os três picos cromatográficos e interferentes), preciso ($\text{DPR}\% \leq 15\%$), exato (bias 85-115%) e robusto. O modelo de calibração utilizada foi o de adição de padrão. No estudo da sazonalidade dos marcadores foi possível observar que houve diminuição significativa da concentração de milonina, warifteína e metilwarifteína entre os meses de fevereiro e abril. Essas diminuições proeminentes para as três moléculas coincidem com o período de frutificação da planta sendo verificado o aparecimento de warifteína e metilwarifteína nos frutos. Essa observação sugere a necessidade da biossíntese dos alcaloides pelos frutos. Através de técnicas espectrométricas e cromatográfica foi isolado e identificado da FAT-r de *C. sympodialis* uma mistura de epímeros a 7'- desmetilroraimina e a 1'- *epi* - 7'- desmetilroraimina que são alcalóides bisbenzilisquinolínicos inéditos na literatura.

Palavras-chaves: CLAE, Menispermaceae, warifteína, metilwarifteína, milonina, *Cissampelos sympodialis*, variação sazonal.

ABSTRACT

The leaf ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis* showed promising activity in different animal models of asthma. Several alkaloids have been isolated and identified in the extract, including warifteine and methylwarifteine (bisbenzylisoquinoline), as well as milonine (morphinandienone). In this work we describe the development and validation of a method for simultaneous quantification of chemical markers in ethanolic extracts applied to the study of seasonality and isolation of two bisbenzylisoquinoline alkaloids. Already for milonine, warifteine and methylwarifteine were isolated, purified and quantified in crude ethanolic extracts of leaves using a methodology developed and validated. The warifteine and methylwarifteine were isolated from total alkaloid fraction of roots (TAF-r) of *C. sympodialis*, whereas that the milonine was isolated from the TAF-l. The structural identification was performed by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of ^1H and ^{13}C , mass spectrometry and infrared spectrometry. The method made use of high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (278 nm) using a reverse phase column C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5mm) and a mobile phase mixture of water-triethylamine (0,05%) (A) : methanol (B) in order gradient: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min.(80%), 25-30 min. (60%). at a rate of 1 mL / min. and running time of 30 min. The chromatographic method was validated in accordance with the recommended resolution of 899 of Agência Nacional de Vigilância Sanitária, and was linear in the concentration range used (2-100 mg / mL), selective (with good separation between the three chromatographic peaks and interfering) and robust. The calibration model used was of standard addition. In the study of seasonality of the markers was observed that there was significant decrease in the concentration of milonine, warifteine and methylwarifteine between February and April. These prominent decreases between the months of February and April for the three molecules coincide with the fruiting period of the plant being observed the appearance of warifteine and methylwarifteine alkaloids in the fruits. This observation suggests the need of the biosynthesis of these alkaloids for the fruits. Through chromatographic and spectrometric techniques was isolated and identified FAT roots of *C. sympodialis* a mixture of the epimers 7'- desmetilroraimine and 1' - epi - 7'- desmetilroraimine bisbenzylisoquinoline alkaloids that are inedited in the literature.

Keywords: HPLC, Menispermaceae, warifteine, methylwarifteine, milonine, *Cissampelos sympodialis*, seasonal variation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos dos frutos de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl tiradas no horto do CBIotec em Junho de 2010.	28
Figura 2 - Mapa de distribuição da família Menispermaceae.	29
Figura 3 - Cromatogramas da FAT-f (A) na concentração de 100 µg/mL e da FAT-r (B) na concentração de 30 µg/mL.	46
Figura 4 - Cromatograma da solução dos padrões a 50 µg/mL de milonina (A), warifteína (B) e metilwarifteína (C) utilizando as condições cromatográficas obtidas na validação do método.	49
Figura 5 - Espectro de infravermelho da milonina em KBr.	50
Figura 6 - Espectro de infravermelho da warifteína em KBr.	51
Figura 7 - Espectro de infravermelho da metilwarifteína em KBr.	52
Figura 8 - Espectro de massas de alta resolução da milonina.	53
Figura 9 - Espectro de massas de alta resolução da warifteína.	54
Figura 10 - Espectro de massas de alta resolução da metilwarifteína.	55
Figura 11- Espectro de RMN de ^1H da milonina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	56
Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT da milonina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	57
Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H da warifteína (CDCl_3 , 500 MHz).	58
Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT da warifteína (CDCl_3 , 500 MHz).	59
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H da metilwarifteína (CDCl_3 , 500 MHz).	60
Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT da metilwarifteína (CDCl_3 , 500 MHz).	61
Figura 17 - Processo de separação cromatográfica de três analitos em função do tempo	63
Figura 18 - Diagrama esquemático de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).	64
Figura 19 - Espectros de UV simples mostrando λ máximos para a milonina, warifteína e metilwarifteína.	69
Figura 20 - Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-10 min (10%), 10-15 min. (30%), 15-25 min. (50%), 25-30 min. (70%); λ = 278 nm;	

coluna C ₁₈ .	70
Figura 21 - Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-5 min. (60%), 5-10 min. (90%), 10-25 min. (95%), 25-30 min. (60%), %); λ = 278 nm; coluna C ₁₈ .	71
Figura 22 - Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (70%), 15-25 min. (75%), 25-30 min. (60%); λ = 278 nm; coluna C ₁₈ .	71
Figura 23 - Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (78%), 25-30 min. (60%) λ = 278 nm; coluna C ₁₈ .	72
Figura 24 - Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL em modo gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (80%), 25-30 min. (60%). λ = 278 nm; coluna C ₁₈ .	73
Figura 25 - Exemplo da adição-padrão na determinação da concentração de milonina, warifteína e metilwarifteína em amostras de extrato etanólico bruto das folhas de <i>C. sympodialis</i> .	77
Figura 26 - Cromatograma da injeção de 100 µg/mL da mistura dos padrões mostrando o espectro de ultravioleta da milonina, warifteína e metilwarifteína.	86
Figura 27 - Cromatograma da injeção do extrato sem adição dos padrões em CLAE/DAD na seletividade do método.	87
Figura 28 - Cromatograma da injeção do extrato com adição de 100 µg/mL dos padrões em CLAE/DAD. na seletividade do método.	87
Figura 29 - Perfil de pureza da milonina (A), warifteína (B) e metilwarifteína (C) no extrato sem adição dos marcadores obtidos em CLAE/DAD na seletividade.	88
Figura 30- Curvas de calibração obtidas no primeiro dia de avaliação da linearidade.	90
Figura 31 - Gráfico de resíduos das primeiras curvas de calibração.	90
Figura 32 - Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no primeiro dia da Linearidade.	91
Figura 33 - Cromatograma do extrato adicionado de 50 µg/mL de marcadores no primeiro dia da Linearidade.	91
Figura 34 - Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50 µg/mL (linha clara) sobrepostos no primeiro dia da Linearidade.	92
Figura 35 - Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no primeiro dia da Linearidade.	92

Figura 36 - Curvas de calibração obtidas no segundo dia de avaliação da linearidade.	94
Figura 37 - Gráfico de resíduos das segundas curvas de calibração.	94
Figura 38 - Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no segundo dia da Linearidade.	95
Figura 39 - Cromatograma do extrato adicionado de 50 µg/mL de marcadores no segundo dia da Linearidade.	95
Figura 40 - Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50µg/mL (linha clara) sobrepostos no segundo dia da Linearidade.	96
Figura 41 - Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no segundo dia da Linearidade.	96
Figura 42 - Curvas de calibração obtidas no terceiro dia de avaliação da Linearidade.	98
Figura 43 - Gráfico dos resíduos das terceiras curvas de calibração.	98
Figura 44 - Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no terceiro dia da Linearidade.	99
Figura 45 - Cromatograma do extrato adicionado de 50 µg/mL de marcadores no terceiro dia da Linearidade.	99
Figura 46 - Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50 µg/mL (linha clara) sobrepostos no terceiro dia da Linearidade.	100
Figura 47 - Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no terceiro dia da Linearidade.	100
Figura 48 - Fração aquosa do extrato (A), perfil cromatográfico do extrato sem adição (B) e cromatograma dos padrões a 100 µg/mL (C). Condições: fluxo 1 mL/min.; modo gradiente: 5-95% em H ₂ O (0,05% TEA) (A): MeOH (B); tempo: 65 min; λ = 278 nm.	101
Figura 49 - Curva de calibração obtida no primeiro dia de precisão e exatidão.	103
Figura 50- Gráfico de resíduos do primeiro dia de precisão e exatidão.	104
Figura 51 - Cromatograma do extrato adicionado de 80 µg/mL de marcadores no primeiro dia de análise de precisão e exatidão	106
Figura 52 - Curva de calibração obtida no segundo dia de precisão e exatidão	108
Figura 53 - Gráfico de resíduos para a segunda curva de calibração na precisão e exatidão	108
Figura 54 - Cromatograma do extrato adicionado de 80 µg/mL de marcadores no	

segundo dia de análise de precisão e exatidão.	111
Figura 55 - Curva de calibração obtida no terceiro dia de precisão e exatidão.	113
Figura 56 - Gráfico de resíduos obtidos com a terceira curva de calibração na precisão e exatidão.	113
Figura 57 - Cromatograma do extrato adicionado de 80 µg/mL de marcadores no segundo dia de análise de precisão e exatidão.	116
Figura 58 - Cromatograma do extrato adicionado de 2 µg/mL de marcadores no estudo da robustez do método.	123
Figura 59 - Cromatograma do extrato adicionado de 4 µg/mL de marcadores no estudo de estabilidade a temperatura ambiente após 8 horas de sua preparação.	127
Figura 60 - Cromatograma do extrato filtrado adicionado de milonina, warifteína e metilwarifteína padrão a 100 µg/mL cada. (A) amostra não submetida à degradação ácido e (B) amostra submetida à degradação ácido.	128
Figura 61 - Curvas de calibração obtida no estudo da sazonalidade.	135
Figura 62 - Gráfico de resíduos da curva de calibração obtida na sazonalidade.	135
Figura 63 - Cromatograma do extrato da sazonalidade sem adição dos marcadores do mês de dezembro obtido em CLAE/DAD.	136
Figura 64 - Perfil de pureza da milonina(A), warifteína(B) e metilwarifteína (C) no extrato das folhas sem adição dos marcadores no estudo da sazonalidade.	137
Figura 65 - Cromatograma do extrato da sazonalidade com adição de 50µg/mL dos marcadores.	138
Figura 66 - Cromatograma do extrato da sazonalidade sem adição dos marcadores ampliado.	139
Figura 67 - Cromatograma do extrato da sazonalidade com adição de 100 µg/mL dos marcadores e ampliado.	139
Figura 68 - Variação da concentração dos marcadores no estudo da sazonalidade.	141
Figura 69 - Cromatograma da injeção dos padrões a 100 µg/mL no estudo da sazonalidade.	142
Figura 70 - Cromatograma da FAT dos frutos maduros (A) e da FAT dos frutos verdes (B).	143
Figura 71 - Índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos maduros com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.	144

Figura 72 - Índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos maduros com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.	145
Figura 73 - Índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos verdes com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.	146
Figura 74 - Índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos verdes com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.	146
Figura 75 - Espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros da Milona (CDCl_3 , 200 MHz).	147
Figura 76 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros da Milona da região de 1,8 a 4,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).	148
Figura 77 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros da Milona da região de 5,0 a 7,1 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).	148
Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H da fração de alcalóides totais (FAT) dos frutos verdes da Milona (CDCl_3 , 200 MHz).	149
Figura 79 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos verdes da Milona da região de 1,8 a 4,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).	149
Figura 80 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos verdes da Milona da região de 5,0 a 7,1 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).	150
Figura 81 - Proposta estrutural para os alcalóides 7' - desmetilroraimina (CsR-1a) e seu isômero 1'- <i>epi</i> - 7'-desmetilroraimina (CsR-1b).	156
Figura 82 - Espectro de massas de alta resolução de CsR.	159
Figura 83 - Espectro de IV de CsR em KBr.	160
Figura 84 - Espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500 MHz).	161
Figura 85 - Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 2,1 a 3,45 ppm.	162
Figura 86 - Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 3,6 a 5,1 ppm.	163
Figura 87 - Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 6,3 a 7,1 ppm.	164
Figura 88 - Espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz).	165
Figura 89 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 10 a 50 ppm.	166

Figura 90 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 54 a 78 ppm.	167
Figura 91 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 100 a 145 ppm.	168
Figura 92 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 140 a 195 ppm.	169
Figura 93 - Espectro de COSY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz).	170
Figura 94 - Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 2,4 a 5,0 ppm.	171
Figura 95 - Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 4,5 a 5,20 ppm.	172
Figura 96 - Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 6,3 a 7,6 ppm.	173
Figura 97 - Espectro de NOESY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz).	174
Figura 98 - Expansão do espectro de NOESY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 2,0 a 5,5 ppm.	175
Figura 99 - Expansão do espectro de NOESY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 6,2 a 8,0 ppm.	176
Figura 100 - Espectro de HMQC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz).	177
Figura 101 - Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 20 a 65 ppm.	178
Figura 102 - Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 54 a 59,5 ppm.	179
Figura 103 - Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 102 a 132 ppm.	180
Figura 104 - Espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz).	181
Figura 105 - Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 25 a 65 ppm.	182
Figura 106 - Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 124 a 176 ppm.	183
Figura 107 - Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 109 a 154 ppm.	184

Figura 108 - Cromatograma da injeção de 50 µg/mL da mistura de epímeros mostrando o índice de similaridade dos compostos **CsR-1a** e **CsR-1b**. 185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alcalóides isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> .	32
Tabela 2- Resultados do primeiro dia de avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.	89
Tabela 3 - Resultados da segunda avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.	93
Tabela 4- Resultados da terceira avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.	97
Tabela 5 - Resultados da curva de calibração para o primeiro dia de precisão e exatidão.	103
Tabela 6 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o primeiro dia de análise.	104
Tabela 7 - Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no primeiro dia de análise.	105
Tabela 8 - Resultados da curva de calibração para o segundo dia de precisão e exatidão.	107
Tabela 9 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o segundo dia de análise.	109
Tabela 10 - Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no segundo dia de análise.	110
Tabela 11 - Resultados da curva de calibração para o terceiro dia de precisão e exatidão.	112
Tabela 12 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o terceiro dia de análise de precisão e exatidão.	114
Tabela 13 - Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no terceiro dia de análise.	115
Tabela 14 - Precisão intra e interdia (DPR%) e exatidão (bias) do método.	117
Tabela 15 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com os parâmetros obtidos na validação.	118
Tabela 16 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a temperatura de 38°C.	119

Tabela 17 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a temperatura de 42°C.	120
Tabela 18 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a coluna C-8.	121
Tabela 19 - Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a fase móvel a 0,1% de trietilamina (TEA).	122
Tabela 20 - Valores de LOD e LOQ estimados a partir das curvas de calibração obtidas no estudo da linearidade	124
Tabela 21 - Área dos picos cromatográficos obtidos logo após a preparação das amostras no estudo de estabilidade a temperatura ambiente.	125
Tabela 22 - Área dos picos cromatográficos obtidos após um tempo de 8 horas a temperatura ambiente e os seus coeficientes de variação.	126
Tabela 23 - Área dos picos cromatográficos em relação à concentração no estudo da sazonalidade das folhas.	134
Tabela 24 - Concentrações obtidas a partir das curvas de calibração na sazonalidade.	140
Tabela 25 - Quantidade de alcalóides totais encontrados em cada mês de estudo da sazonalidade das folhas.	141
Tabela 26 - Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da 7'-desmetilroraimina (CsR-1a) e 1'- <i>epi</i> - 7'- desmetilroraimina (CsR-1b) em CDCl_3 (<i>J</i> em Hz).	157
Tabela 27 - Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dos compostos CsR-1a e CsR-1b em CDCl_3 comparados com os valores descritos na literatura para 3 e 4 .	158

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Marcha de extração e isolamento da warifteína e metilwarifteína.	41
Esquema 2 - Marcha sistemática para extração e isolamento da milonina.	44
Esquema 3 - Marcha sistemática para obtenção da FAT dos frutos maduros e FAT dos frutos verdes da <i>C. sympodialis</i> .	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação taxonômica de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	29
Quadro 2 - Núcleo básico dos alcalóides isolados do gênero <i>Cissampelos</i> .	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CBiotec: Centro de Biotecnologia

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CC: cromatografia em coluna

C₁₈: Octadecilsilano

CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

EEBR: Extrato etanólico bruto das raízes

EBF: Extrato etanólico bruto das folhas

ESI: Electrospray

FAR: Fração aquosa da raiz

FAF: Fração aquosa das folhas

FAT-r: Fração de alcalóides totais das raízes

FAT-f: Fração de alcalóides totais das folhas

FO: Folhas

FT-IR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

MeOH: Metanol

MWAR: Metilwarifteína

MS: Espectro de Massas

μL: microlitros

OVA: Ovalbumina

PDE: Fosfodiesterases

RA: Raiz

RDC: Resolução da diretoria colegiada

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROC: Canais operados por receptores

TEA: trietilamina

UV-VIS: Ultravioleta-visível

WAR: Warifteína

VOC: Canais operados por voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVO	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27

CAPÍTULO I: Caracterização dos marcadores

3 Introdução.....	28
3.1 Aspectos Botânicos de <i>Cissampelos sympodialis</i>	28
3.2 Perfil químico da família <i>Menispermaceae</i>	29
3.3 O Gênero <i>Cissampelos</i>	30
3.4 <i>Cissampelos sympodialis</i>	31
3.5 Aspectos farmacológicos.....	36
4 Materiais e método.....	39
4.1 Reagentes e materiais.....	39
4.2 Material vegetal	39
4.2.1 Obtenção da warifteína e metilwarifteína das raízes da planta nativa.....	39
4.2.2 Obtenção da milonina das folhas no horto do CBiotec.....	39
4.3 Ensaios cromatográficos	40
4.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas para o estudo da validação..	40
4.5 Obtenção da warifteína e metilwarifteína.....	40
4.6 Obtenção da milonina.....	42
4.7 Perfil cromatográfico da Fat-f e Fat-r.....	45
4.8 Caracterização espectroscópica dos alcalóides.....	45
5 Resultados e discussão.....	46
5.1 Dados espectroscópicos.....	47
5.1.1 Milonina.....	47
5.1.2 Warifteína.....	47
5.1.3 Metilwarifteína.....	48

CAPÍTULO II: Desenvolvimento do método

6 Introdução.....	62
6.1 Princípios da cromatografia.....	62
6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	63
6.3 Desenvolvimento de métodos cromatográficos em CLAE.....	65
7 Materiais e método.....	68
7.1 Reagentes e materiais.....	68
7.2 Escolha do comprimento de onda	68
7.3 Escolha do fluxo e da concentração da fase móvel.....	68
8 Resultados e discussão.....	69
8.1 Escolha do comprimento de onda	69
8.2 Escolha do fluxo e da concentração da fase móvel.....	69

CAPÍTULO III: Validação do método

9 Introdução.....	74
9.1 Validação de metodologias analíticas para medicamentos fitoterápicos...74	
9.1.1 Especificidade e seletividade.....	75
9.1.2 Linearidade.....	76
9.1.3 Intervalo.....	78
9.1.4 Precisão.....	78
9.1.5 Limite de detecção.....	79
9.1.6 Limite de quantificação.....	79
9.1.7 Exatidão.....	80
9.1.8 Robustez.....	80
10 Material e métodos.....	81
10.1 Reagentes e materiais.....	81
10.2 Seletividade.....	81
10.3 Linearidade.....	82
10.4 Precisão e exatidão.....	83
10.5 Robustez.....	84
10.6 Limite de detecção e limite de quantificação.....	84
10.7 Estudo de estabilidade a temperatura ambiente.....	85

10.8	Degradação ácida.....	85
11	Resultados e discussão	86
11.1	Seletividade.....	86
11.2	Linearidade.....	89
11.3	Precisão e exatidão.....	102
11.4	Robustez.....	118
11.5	LOD e LOQ.....	124
11.6	Estudo de estabilidade a temperatura ambiente.....	125
11.7	Degradação ácida.....	127

CAPÍTULO IV: Sazonalidade

12	Introdução.....	129
13	Material e métodos.....	130
13.1	Reagentes e materiais.....	130
13.2	Obtenção dos extratos para o estudo da sazonalidade.....	131
13.3	Quantificação dos marcadores nos extratos obtidos.....	131
13.4	Metodologia de preparação da FAT dos frutos da milona.....	131
13.5	Avaliação dos marcadores nos frutos.....	132
14	Resultados e discussão	134
14.1	Estudo da Sazonalidade.....	134

CAPÍTULO V: Elucidação estrutural

15	Elucidação estrutural do composto CsR.....	151
16	CONCLUSÕES.....	186
17	REFERÊNCIAS.....	187

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo, contando com um valor aproximado de mais de 20% do número total de espécies do planeta e com um número de espécies vegetais superior a 55 mil descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRANDÃO et al, 2006 & FERRO et al, 2006). Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (VEIGA et al, 2008 & RODRIGUES, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) revela que mesmo com os avanços alcançados nos últimos 30 anos no que se refere às políticas públicas, uma grande parte da população ainda não tem acesso regular a serviços de saúde convencionais e medicamentos essenciais principalmente em países considerados de menor desenvolvimento (ARNOUS et al, 2005). Uma alternativa ao tratamento convencional é o uso de plantas medicinais e seus derivados, prática que as agências internacionais têm enviado esforços para garantir sua segurança e eficácia (MOURA et al, 2001).

Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae), conhecida popularmente por milona, é uma espécie encontrada no Nordeste e Sudeste do Brasil. A infusão das suas cascas das raízes é usada pela medicina popular para o tratamento de asma, artrite, reumatismo, bronquite e outras doenças inflamatórias (ALEXANDRE-MOREIRA et al, 2003a; ALEXANDRE-MOREIRA et al, 2003b). Estudos fitoquímicos de extrato das raízes de *C. sympodialis* revelaram a presença de alcalóides aporfínicos, bisbenziltetraidroisoquinolínicos e tetraidroprotoberberínicos e estes estudos culminaram com o isolamento de três alcalóides terciários (warifteína, metilwarifteína e milonina), um alcalóide quaternário (laurifolina) e um alcalóide com esqueleto morfinâmico (milonina). Warifteína apresentou ser um componente com ação espasmolítica (ALEXANDRE-MOREIRA et al, 2003a). LIRA e colaboradores (2002) isolaram um novo alcalóide bisbenzilisoquinolínico das raízes de *Cissampelos sympodialis* denominado de roraimina.

No Brasil, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. As ações decorrentes dessa política, manifestadas em um programa são importantes para a melhoria do acesso da população a plantas medicinais e fitoterápicos. Neste sentido foi criado a portaria interministerial nº 2960 ,

de 9 de dezembro de 2008, onde aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) cujos objetivos são a garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, desenvolvimento de tecnologias e inovações, fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2009).

Em relação à qualidade dos medicamentos, o perfil de segurança e eficácia é obtido por meio da análise dos ensaios clínicos (fase 3) de novos produtos ou da revisão bibliográfica de utilização em diferentes subgrupos populacionais em produtos de uso tradicional. Para os medicamentos genéricos e similares não há necessidade de se repetir os ensaios clínicos (fase 3), desde que seja comprovada equivalência farmacêutica (teste *in vitro*) e bioequivalência (teste *in vivo*, biodisponibilidade relativa) para os que necessitam ser absorvidos pelo trato gastrointestinal (BRASIL, 2004)

Devido a complexibilidade que têm um extrato vegetal e a sua enorme variância regional em termos de componentes químicos, existe a necessidade de padronização de matérias-primas vegetais, como a milona, através do desenvolvimentos e validação de métodos analíticos específicos que quantifiquem os seus marcadores no extrato etanólico bruto e em outras formulações, para garantir uma melhor qualidade de um possível fitoterápico que venha a surgir.

A qualidade dos medicamentos fitoterápicos é possível através de técnicas cromatográficas capazes de avaliar as características qualitativas e quantitativas da droga vegetal. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector UV com arranjo de fotodiodos (CLAE/UV-DAD), demonstra com a precisão e sensibilidade adequadas, informações a respeito de possíveis marcadores presentes nas plantas através de uma comparação espectral UV-Visível. Outras técnicas mais seletivas e sensíveis também são utilizadas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE/EM), ou CLAE acoplado a um Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (CLAE/RMN- ^1H).

Existem normas da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que regulam a área de medicamentos fitoterápicos como a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004 que foi revogada pela RDC 14 de 31 de Março de 2010, com o objetivo de atualizar o regulamento para o registro de medicamentos fitoterápicos. As principais modificações foram relativas a conceitos e a adoção de alternativas ao controle de qualidade. O documento traz uma reforma da RDC 48 de 2004, com o enquadramento correto para cada exigência nas diferentes fases de análise de registro de um

medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010). Outra resolução de suma importância é a Resolução-RE nº 899, de 29 de Maio de 2003 da ANVISA que estabelece o **Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Esta Resolução estabelece que um método para ser validado deva apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade adequada a análises (RESOLUÇÃO 899, 2003).

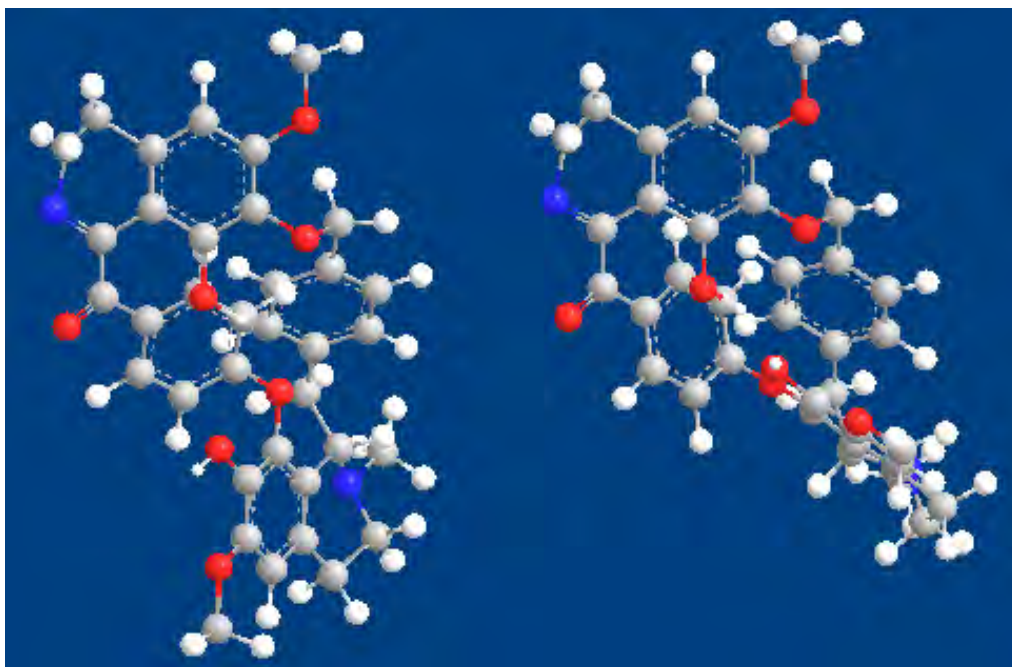
2. OBJETIVOS:

2.1 Geral:

Desenvolver e validar um método analítico que quantifique simultaneamente os marcadores químicos no extrato etanólico bruto das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl, isolar e identificar outros alcalóides.

2.2 Específicos:

- 1 Caracterizar os marcadores milonina, warifteína e metilwarifteína através de métodos físico-químico;
- 2 Desenvolver metodologia analítica empregando análise cromatográfica (CLAE) para separação, identificação e quantificação da warifteína, metilwarifteína e milonina;
- 3 Validar a metodologia analítica desenvolvida;
- 4 Fazer o estudo da sazonalidade dos marcadores químicos;
- 5 Isolar e identificar outros constituintes químicos de *C. sympodialis* Eichl através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.



Capítulo I

Caracterização dos marcadores

3. INTRODUÇÃO

3.1 Aspectos Botânicos de *Cissampelos sympodialis*

C. sympodialis é uma trepadeira encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do país, do Ceará a Minas Gerais. Frequentemente ocorre em áreas abertas como subarbusto escandente em solo argiloso. Constitui-se de ramos volúveis, pubérulos, acinzentados. Possui folhas alternas, notadamente peltadas, glabras; e seu pecíolo mede cerca de 2 cm de comprimento, se apresenta espessado no ápice e na base; a lâmina é cartácea oval, triangular-lanceolada ou sub-ovada, com base truncada, ápice e margem levemente revoluta. Suas inflorescências são dióicas, axilares em panículas fasciculatas, e medem 8-10 cm de comprimento. Enquanto, a flor masculina apresenta-se com quatro pétalas e dois estames concrescidos em sinândrio a flor feminina possui duas pétalas, alvacentas e ovário unicarpelar. Seu fruto é drupáceo, obovado e vermelho alaranjado quando maduro medindo cerca de 1,0-1,5 cm de diâmetro (EICHLER, 1887). A Figura 1 mostra fotos da planta obtidas no horto do CBiotec em seu período de frutificação. O Quadro 1 mostra a classificação taxonômica de *C. sympodialis* (CRONQUIST, 1881).



Figura 1: Fotos dos frutos da *Cissampelos sympodialis* Eichl tiradas no horto do CBiotec em Junho de 2010.

Quadro 1: Classificação taxonômica de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUB-CLASSE	Magnoliidae
ORDEM	Ranunculales
FAMÍLIA	Menispermaceae
GÊNERO	<i>Cissampelos</i>
ESPÉCIE	<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl

3.2 Perfil químico da família Menispermaceae

A família Menispermaceae é responsável pela produção de uma grande variedade de alcaloides. A última revisão da família Menispermaceae, publicada por Barbosa-Filho e colaboradores (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000) revela que o perfil dos alcaloides desta família é constituído por vinte e três grupos de alcaloides. Um total de 1522 alcaloides foram isolados no período de 1970 a 1997. Destacam-se em abundância os alcaloides bisbenzilisquinolínicos (604 do total) isolados durante este período, seguido pelos aporfínicos (303) e os protoberberínicos (275) em 160 espécies diferentes (ARAGÃO, 2002).

A família Menispermaceae é constituída por aproximadamente 72 gêneros e 400 espécies, entre os quais, os gêneros mais predominantes em número de espécies são: *Stephania* formado por 43 espécies, *Tinospora* 35, *Abuta* 33, *Tiliacora* 22, *Cissampelos* e *Cyclea* ambos com 19 espécies. No Brasil a família está representada por um total de 12 gêneros com 106 espécies (LIRA, 2002). A Figura 2 mostra o mapa mundial de distribuição da família Menispermaceae.

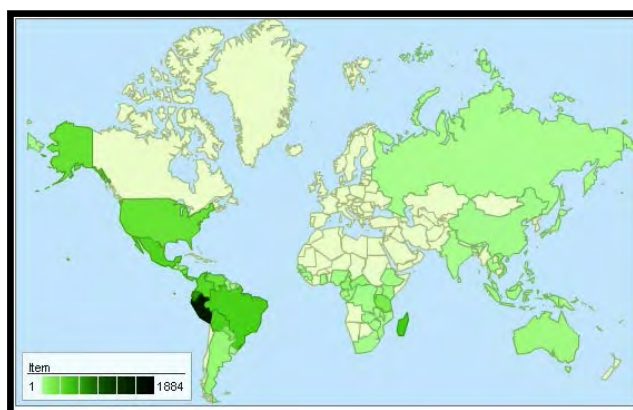
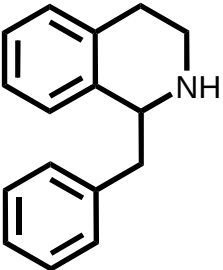
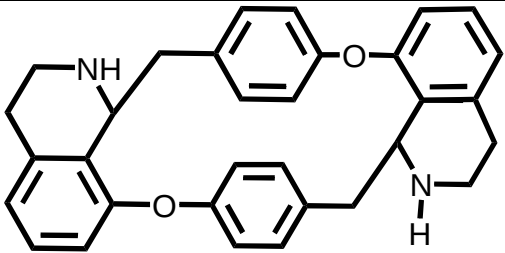
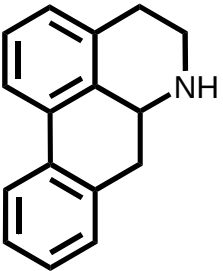
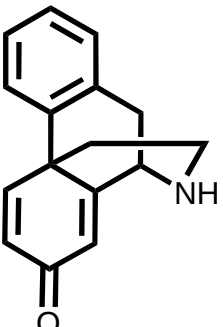


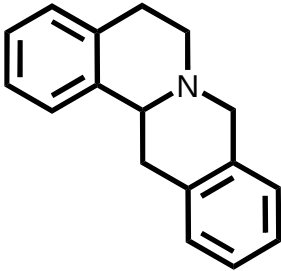
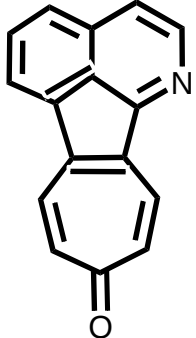
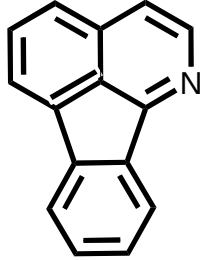
Figura 2: Mapa de distribuição da família Menispermaceae.
 Mobot: <http://www.tropicos.org/Name/42000034?tab=maps>

3.3 O Gênero *Cissampelos*

O gênero *Cissampelos* compreende 19 espécies, das quais nove ocorrem no Brasil (SANTOS, 2002; ARAGÃO, 2002). Das três espécies encontradas na Paraíba, *C. sympodialis*, *C. glaberrima* e *C. ovalifolia*, as duas primeiras foram as melhores estudadas, devido a sua maior disponibilidade. Segundo BARBOSA-FILHO e colaboradores (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997), os alcalóides presentes neste gênero são quimicamente conhecidos como derivados de núcleo isoquinolínico e todas as 53 bases descritas na literatura pertencem a 7 tipos de esqueletos diferentes. (Quadro 2)

Quadro 2: Núcleo básico dos alcalóides isolados do gênero *Cissampelos*.

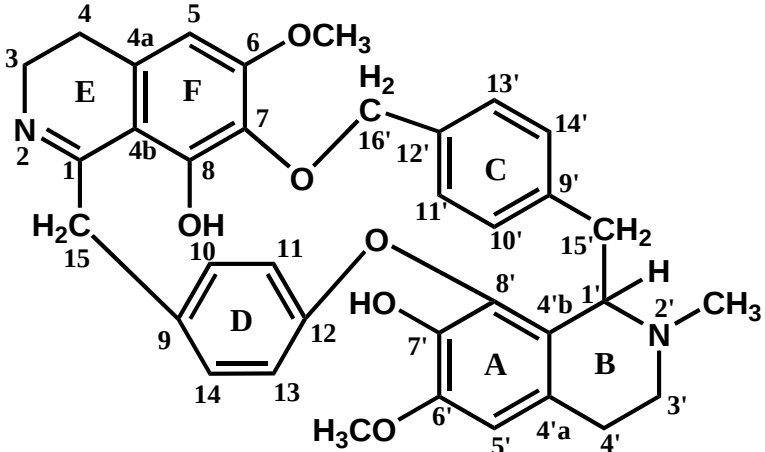
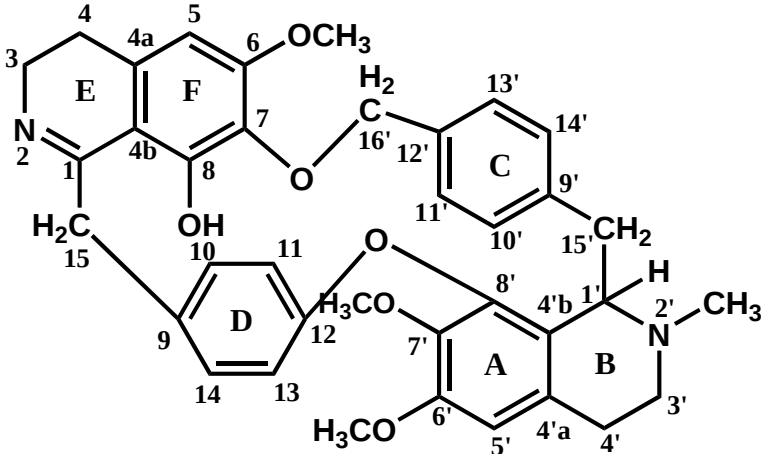
Benzilisoquinolínico (BIQ)	
Bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ)	
Aporfínico (APORFIN)	
Morfinândienônico (MORFIN)	

Tetrahidroprotoberberínico (PROTOB)	
Tropoloisoquinolínico (TROPOLI)	
Azafluorantênico (AZAFLU)	

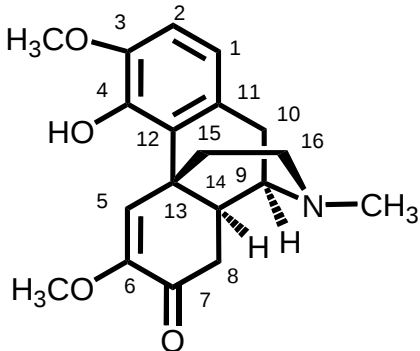
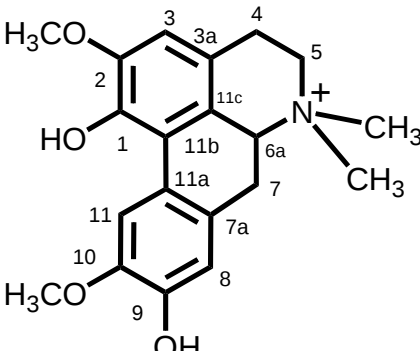
3.4 *Cissampelos sympodialis*

O estudo fitoquímico de *C. sympodialis* no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (CBiotec) levou ao isolamento de seis alcalóides. Quatro destes alcalóides são terciários: warifteína, metilwarifteína, simpodialina β ,*N*-óxido (bisbenzilisquinolínicos), milonina (morfinâmico), e um quaternário, do tipo aporfínico: a laurifolina (Tabela 1, pág. 32). O alcalóide isolado em maior quantidade foi a warifteína, que foi encontrada nas raízes com um alto rendimento, correspondente a 1,4%, permitindo ao mesmo tempo um estudo farmacológico (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997). As raízes da mesma planta, além destes cinco alcalóides ocorreu o isolamento e a elucidação estrutural de um novo alcalóide bisbenzilisquinolínico, denominado de roraimina (LIRA, 2002), um aporfínico liriodenina e das folhas um benzilisquinolínico a coclaurina (Tabela 1, pág. 32).

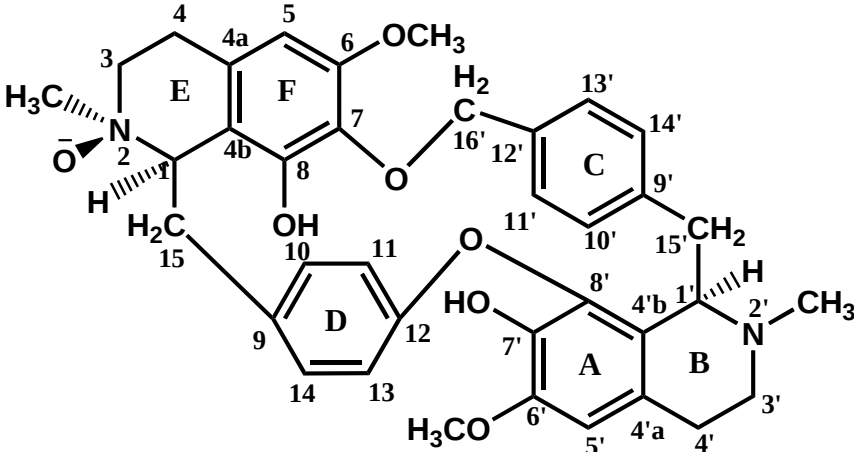
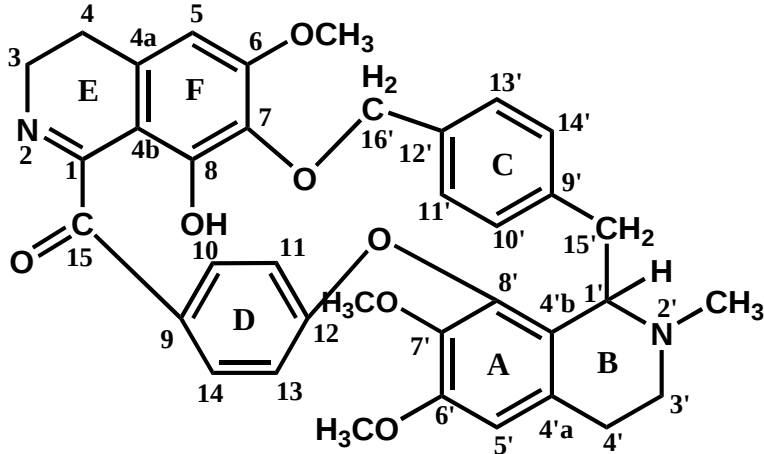
Tabela 1: Alcalóides isolados de *Cissampelos sympodialis*.

Estrutura	Alcalóides	Parte da planta	Classe	Referência
	Warifteína	Raiz e folha	BIS-BIQ	CÔRTEZ, 1992; FREITAS, 1994; ALENCAR, 1994
	Metilwarifteína	Raiz e folha	BIS-BIQ	CÔRTEZ, 1992; FREITAS, 1994; ALENCAR, 1994

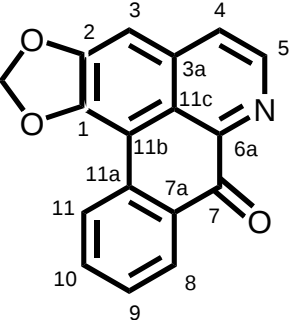
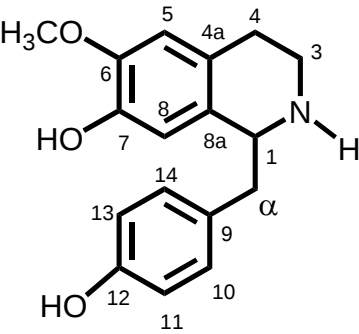
Cont. Tabela 1

Estrutura	Alcalóides	Parte da planta	Classe	Referência
	Milonina	Folhas	MORFIN	ALENCAR, 1994
	Laurifolina	Raizes	APORFIN	ALENCAR, 1994

Cont. Tabela 1

Estrutura	Alcalóides	Parte da planta	Classe	Referência
	Simpodialina β N-óxido	Raízes	BIS-BIQ	ALENCAR, 1994
	Roraimina	Raízes	BIS-BIQ	LIRA, 2002

Cont. Tabela 1

Estrutura	Alcalóides	Parte da planta	Classe	Referência
	Liriodenina	Raízes	APORFIN	LIRA, 2001
	Cocclaurina	Folhas	BIQ	LIRA, 2001

3.5 Aspectos Farmacológicos de *C. sympodialis*

No Nordeste brasileiro, doenças como asma, influenza, bronquite e reumatismo são tradicionalmente tratados com infusões das cascas das raízes de *Cissampelos sympodialis*, popularmente conhecida, na região, como milona, abuteira e orelha de onça (CORREA, 1929).

Estudos farmacológicos demonstraram que a fração hidrossolúvel do extrato etanólico das cascas das raízes de *Cissampelos sympodialis* causou inibição do tônus espontâneo, similar à isoprelina e aminofilina; os efeitos do extrato foram parcialmente revertidos pelo propranolol. A referida planta também antagonizou, de forma inespecífica, as contrações induzidas por carbacol, histamina, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e Substância P, em preparações de traquéia isolada de cobaia e aumentou os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) em leucócitos alveolares de cobaia (THOMAS *et al*, 1995).

A warifteína e metil-warifteína também produziram efeitos espasmolíticos, mas com potências bem inferiores a fração aquosa do extrato etanólico das cascas das raízes (FAR) (CÔRTEZ *et al*, 1995; FREITAS *et al.*, 1996). A simpodialina β -N-óxido e a laurifolina foram inefetivos (ALENCAR, 1994) e a milonina não foi testada devido a pequena quantidade obtida (FREITAS, 1994).

Um outro estudo (THOMAS *et al*, 1997a) revelou que a fração aquosa do extrato etanólico das folhas desta planta (FAF) teve potência similar àquela das raízes em relaxar músculo liso de traquéia e ainda inibiu o broncoespasmo induzido por histamina em cobaia normal e a resposta anafilática induzida por antígeno em cobaia sensibilizada com ovalbumina (OVA), sugerindo que, provavelmente, a warifteína não é a única e principal substância ativa desta planta. Além da potência da FAF ser similar a da FAR, em camundongos, esta fração foi consideravelmente menos tóxica quando comparada àquela obtida das raízes (DINIZ *et al*, 1995).

Em estudos preliminares sobre migração celular foi observado que cobaias sensibilizadas com OVA e tratadas com FAF, apresentaram no lavado broncoalveolar, um aumento significativo de células mononucleares sem que houvesse alterações no percentual de eosinófilos ou neutrófilos sugerindo, portanto, uma atividade quimiotática para células mononucleares. As investigações posteriores indicaram que FAF inibe as fosfodiesterases nucleotídeo cíclico (PDE) IV e V obtidas dos pulmões de cobaia e aumenta os níveis de AMPC em cultura de células do músculo liso de traquéia

(THOMAS *et al*, 1997b). Estudos com neutrófilos periféricos humanos também indicaram que a FAF tem atividade inibitória sobre degranulação induzida por formyl-Met.Phe.Pro., e que também aumenta os níveis de AMPc e a atividade da proteína quinase A dependente de AMPc em neutrófilos (THOMAS *et al*, 1999).

Os estudos acima mostraram que a FAF tem atividade broncodilatadora tanto *in vivo* como *in vitro*, inibe a liberação de mediadores de neutrófilos e pode agir através do aumento dos níveis de AMPc devido a estimulação direta da adenilato ciclase ou por inibição de PDE, como o faz a teofilina. No entanto, estudos adicionais mostraram que a FAF apresenta atividade antidepressiva a nível do sistema nervoso central (Almeida *et al*, 1998), contracturante vascular (FREITAS *et al*, 2000) e hipertensiva (MEDEIROS *et al*, 1998).

A partir de estudos realizados com a warifteína, observou-se um antagonismo reversível, não específico e não competitivo à histamina, carbacol e bradicinina em íleo de cobaia. A warifteína também antagonizou contrações induzidas por ocitocina e bradicinina em útero de rato, enquanto que, em traquéia de cobaia, o alcalóide inibiu o tônus espontâneo (CÔRTES *et al*, 1995).

Segundo CÔRTES (1992), em traquéia de cobaia a warifteína induziu um relaxamento direto, que mostrou ser 5,1 vezes mais potente do que a aminofilina. A ação relaxante da warifteína deve-se a sua ação inibitória dos canais de Ca^{+2} operado por receptor (ROC) e canal de Ca^{+2} operado por voltagem (VOC), assim como da liberação de Ca^{+2} intracelular, especificamente dos estoques sensíveis a noradrenalina. Esta inespecificidade da warifteína indica que a ação inibitória desta substância, no movimento intra e extracelular de Ca^{+2} , podem derivar da ativação ou inibição de mecanismos indiretos de controle deste movimento.

Corroborando com o trabalho realizado por CÔRTES (1992), FREITAS (1994) concluiu que a warifteína exerce sua ação espasmolítica sobre músculo vascular através da inibição dos canais de Ca^{+2} de membrana, tanto dos operados por voltagem quanto dos operados por receptores e ainda através da inibição da liberação e da reestocagem do Ca^{+2} intracelular somente dos estoques sensíveis à noradrenalina.

Em musculatura esquelética a warifteína foi 1,4 vezes mais potente do que a metilwarifteína, em inibir as contrações induzidas pela estimulação indireta do nervo frênico do músculo diafragma de rato. A atividade espasmolítica não depende de liberação de mediadores de células endoteliais ou epiteliais, ou da possível atividade

anestésica local da warifteína. Este efeito se dá por uma ação pós-sináptica sobre a membrana do músculo esquelético, mas não sobre as fibras contráteis intracelulares (ALENCAR, 1994).

Estudos farmacológicos usando administração oral de extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sympodialis* em camundongos sensibilizados por ovalbumina em modelo experimental de asma, resultaram na diminuição dos níveis de IgE total e IgE específica, fazendo com que sugerissem atividade antialérgica através da diminuição da produção de IgE juntamente com atividade imunomodulatória de citocinas (BEZERRA-SANTOS *et al*, 2004). Da mesma forma, a warifteína administrada oralmente demonstrou ser um componente ativo responsável pelo efeito antieosinófilo no extrato, porque reproduziu o efeito inibitório na eosinofilia alérgica e na produção de leucotrienos em camundongos sensibilizados com ovalbumina (BEZERRA-SANTOS *et al*, 2006). Outros resultados mostraram que camundongos tratados com warifteína além de reduzir respostas associadas com alergia, como em edema de pata e choque anafilático induzidos por ovalbumina, também demonstraram atividade anti-nociceptiva (COSTA *et al*, 2008). O mesmo efeito antialérgico do extrato *C. sympodilis* e da warifteína foram encontrados usando modelo experimental de alergia com ácaros da espécie *Blomia tropicalis* (CERQUEIRA-LIMA *et al*, 2010).

Outros estudos farmacológicos usando a milonina demonstraram relaxamento da musculatura lisa do endotélio da artéria mesentérica de ratos através de efeitos hipotensivos e vasorrelaxantes mediado pelo endotélio via liberação de óxido nítrico e abertura de canais de potássio (CAVALCANTE *et al*, 2011).

Estudos toxicológicos com a warifteine e milonina em cultura de hepatócitos e fibroblastos V79 de ratos demonstraram que a milonina foi menos tóxica que a warifteína em ambas as culturas de células e que o efeito tóxico dos dois alcalóides são independente para o citocromo P450 (MELO *et al*, 2003).

Além do efeito antialérgico do extrato de *C. sympodilis* também foi relatado na literatura o efeito antidepressivo que foi similar a imipramina onde reduziu o período de imobilidade no teste de natação forçada em camundongos e reverteu o grau de ptose e catalepsia induzida por reserpina em ratos (ALMEIDA *et al*, 1998).

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Reagentes e materiais:

- 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) seg. (BROCKMAN, MERCK).

4.2 Material vegetal

4.2.1 Obtenção da warifteína e metilwarifteína das raízes da planta nativa

As raízes de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae) aqui pesquisadas foram coletadas por raizeiros no sítio Riacho dos Xavies, que fica no município de Vieirópolis, a 20 Km do município de Souza, em agosto de 2006. As raízes foram utilizadas por conterem maior concentração de warifteína e metilwarifteína em relação às folhas (BARBOSA-FILHO *et al*, 1997).

4.2.2 Obtenção da milonina das folhas no horto do CBiotec

As folhas foram coletadas no próprio horto do CBiotec por conterem milonina, não sendo verificado a presença deste alcalóide nas raízes da planta (BARBOSA-FILHO *et al*, 1997). O período de coleta foi em Março de 2008. A identificação botânica foi realizada pela Prof. Dra. Fátima Agra, e uma amostra se encontra depositada no herbário Lauro Pires Xavier desta Universidade com o código Agra 1456.

Para os estudos da validação de metodologia analítica e da sazonalidade foram utilizadas as folhas do próprio horto do CBiotec.

4.3 Ensaios cromatográficos

As cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) e em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck (Alemanha, M= 60,09 g/mol) na espessura de 1,0 e 0,25 mm, respectivamente. A sílica foi adicionada em um béquer (capacidade 500 mL) com água destilada até formar uma suspensão na proporção de 35 g de sílica para três vezes o volume de água na CCDA e 80 g de sílica para três vezes o volume de água na CCDP, distribuída sobre placas de vidro através de um espalhador do tipo “Quick fit”, secas ao ar e ativadas em estufa a 110°C por 2 horas. A cromatografia em coluna (CC) foi utilizada tendo como adsorvente o óxido de alumínio 90 (Al₂O₃) (M= 101,94 g/mol) seg. (MERCK).

4.4 Obtenção do extrato hidroalcolólico das folhas para o estudo da validação

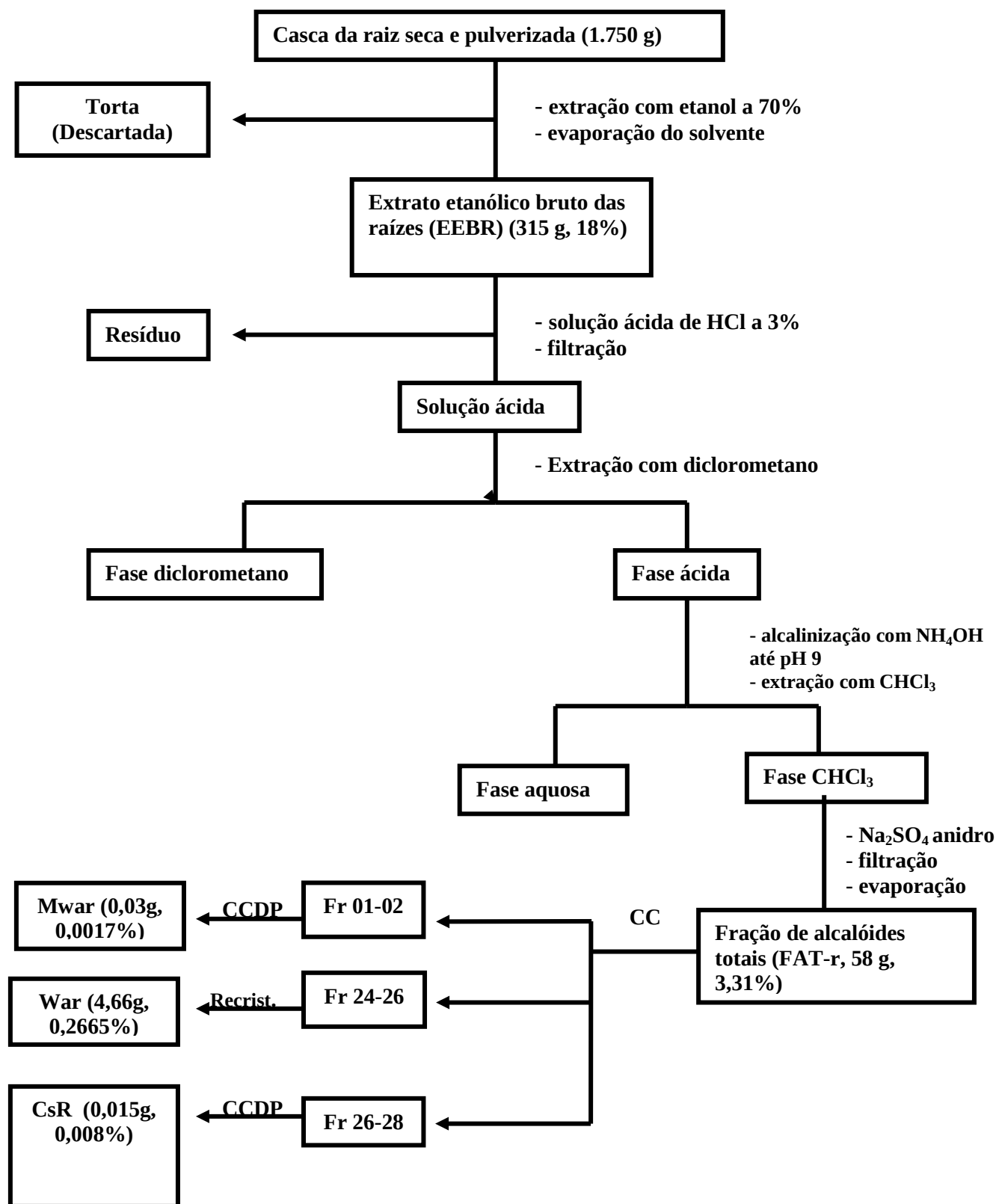
As folhas (FO) de *Cissampelos sympodialis* frescas foram secas em estufa com ar circulante a 40°C, trituradas (1 Kg), e submetidas a três macerações consecutivas com etanol a 96° GL durante um tempo total de 9 dias, com intervalo entre uma extração e outra de 3 dias. A solução etanólica foi evaporada sob pressão reduzida em rotavapor a 60°C resultando em um extrato bruto (EBF), concentrado de coloração verde-escura (124 g, 12,40%). Amostras do extrato etanólico foram preparadas dissolvendo o extrato (250 mg) com etanol:0,05% de solução aquosa de trietilamina (6:4, v/v) em balão volumétrico de 10 mL, sendo depois sonificado por 30 min. em banho de ultrassom para obter uma solução a 25 mg/mL, no qual foi filtrada usando uma seringa com filtro de 0,45 µm.

4.5 Obtenção da warifteína e metilwarifteína

O isolamento e purificação da warifteína e metilwarifteína se desenvolveram adotando a seguinte metodologia (Esquema 1, pág. 41): a FAT-r foi aplicada em coluna cromatográfica com alumina (Al₂O₃) se obtendo um total de 88 frações. Estas frações foram analisadas em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com seus R_fs (MARINHO 2008). Da fração Fr 24-26 foi isolada e purificada por recristalização em metanol a quente a warifteína, enquanto a Fr 01-02 por CCDP

forneceu a metilwarifteína.

Esquema 1: Marcha de extração e isolamento da warifteína e metilwarifteína das raízes de *C. sympodialis* (MARINHO, 2008).



4.6 Obtenção da milonina

As folhas da *Cissampelos sympodialis* secas e pulverizadas (6700 g) foram submetidas à extração com etanol:H₂O (7:3) por três semanas e a solução hidroalcolica foi concentrada a vácuo em um Evaporador rotatório sob pressão reduzida, com temperatura de 60°C resultando, após concentração em rotaevaporador, em 980 g (14,62%) de extrato etanólico bruto das folhas (EEBF) com coloração verde escura. Este extrato foi submetido a uma marcha sistemática para isolamento da milonina (Esquema 2, pág. 44).

Uma parte do EEBF (480 g) foi tratado com uma solução de ácido clorídrico a 3% (1000 mL) sob agitação até pH 2,0-3,0. Em seguida a solução ácida foi filtrada em um funil de Buchner com celite e o filtrado foi submetido a várias extrações com clorofórmio para remover, principalmente, graxas e outras impurezas apolares solubilizadas. A fase clorofórmica foi concentrada em evaporador rotatório e armazenada para estudos futuros. A fase aquosa (600 mL) foi basificada com hidróxido de amônio sob forte agitação até chegar a pH = 9,0, e extraída exaustivamente com clorofórmio até reação negativa com o reagente de Dragendorff. A outra parte do EEBF (500 g) foi submetida ao mesmo processo de extração.

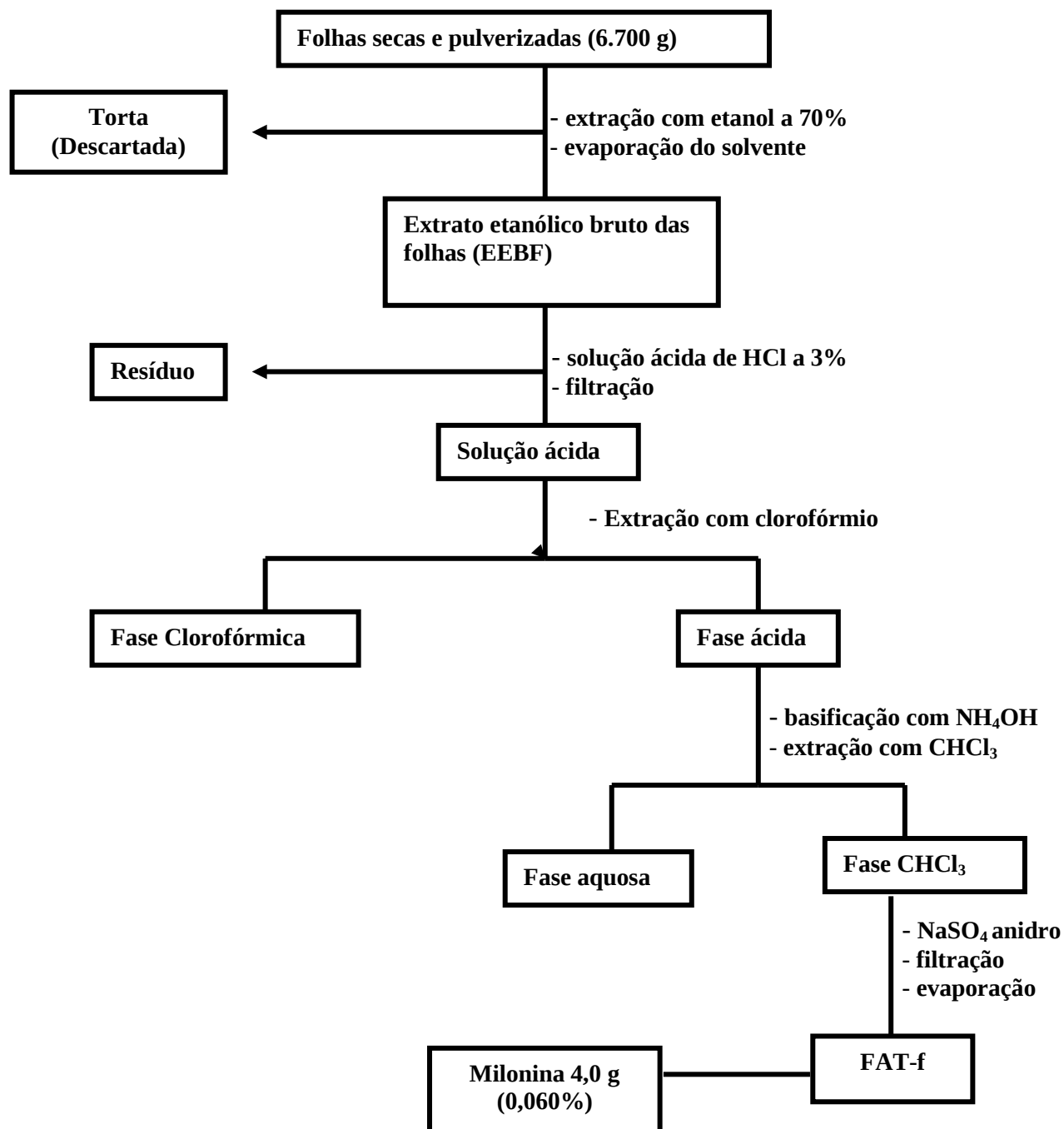
A fase aquosa basificada foi descartada e a clorofórmica foi lavada com água, desidratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida a 55°C em evaporador rotatório, obtendo-se a fração dos alcalóides totais das folhas (FAT-f) (30 g, 0,45%).

Para preparação da coluna cromatográfica (CC) suspendeu-se a alumina (Al₂O₃) (300 g) em clorofórmio e esta suspensão foi sendo colocada à coluna de vidro. A coluna foi então condicionada com um volume de 500 mL de clorofórmio.

A FAT-f foi triturada com Al₂O₃ em grau com pistilo, fazendo-se uma mistura. A mistura foi colocada com bastante cuidado na coluna que já estava com solvente suficiente para encobri-la e depois se colocou mais um pouco de Al₂O₃ para evitar o refluxo. A eluição teve início com clorofórmio e as três primeiras frações foram coletadas a cada 50 mL, depois foram coletadas de 100 em 100 mL até que o solvente se mostrou incolor. Depois a polaridade do sistema de solvente foi sendo aumentado gradativamente para CHCl₃:MeOH (98:2), depois CHCl₃:MeOH (95:5) e por último CHCl₃:MeOH (90:10). Foram obtidas 59 frações no total.

As frações coletadas foram aplicadas em cromatografia em camada delgada analítica e observadas as que possuíam os mesmos Rfs. O sistema de solventes utilizado para eluição das placas foi CHCl_3 :MeOH (95:5). Na primeira placa foram aplicadas as frações da Fr-01 a Fr-19 e foram reunidas: Fr 01-02, Fr 03-06 e Fr 07-19. A fração reunida Fr 07-19 (3 g) foi confirmada como sendo a milonina através do RMN de ^1H e ^{13}C comparados com os dados da literatura (FREITAS et al, 1995). Na segunda placa analítica foram aplicadas as frações da Fr 20 a Fr 59 e foram reunidas as frações Fr 20-37. A Fr 20-37 (1 g) foi também confirmada como sendo milonina. A milonina foi purificada utilizando cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) cujo sistema de solvente foi CHCl_3 :MeOH (95:5).

Esquema 2: Marcha sistemática para extração e isolamento da milonina.



4.7 Perfil cromatográfico da Fat-f e Fat-r

A Fat-f e Fat-r obtidas foram pesadas em balança analítica (5 mg cada) e solubilizadas em balão volumétrico (5 mL) com metanol. As soluções estoque resultantes (1 mg/mL) foram diluídas, sendo a Fat-f diluída para 100 µg/mL e a Fat-r para 30 µg/mL, e depois injetadas no CLAE-UV-Vis para obter o perfil cromatográfico.

4.8 Caracterização espectroscópica dos alcalóides

O espectro de infravermelho foi obtido por transformada de Fourier (FT-IR) no Laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola para análise e confirmação dos grupos químicos existentes nos alcalóides. O equipamento utilizado para realização dos espectros foi um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IR-FT) da marca SHIMADZU e modelo Prestige21. Os alcalóides foram dispersos usando pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram em um espectrômetro da marca Varian Systems de 500 MHz. Os espectros da warifteína e metilwarifteína foram adquiridos em CDCl_3 e o da milonina em pyridine- d_5 . Os espectros da substância CsR foram adquiridos em CDCl_3 e depois em pyridine- d_5 .

Os espectros de massas das substâncias foram obtidas em espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por electrospray com marca da Bruker e modelo micrOTOF II cujo modo de ionização foi em electrospray positivo (ESI+). Amostras dos alcalóides foram preparadas nas concentrações de 1 µg/mL em metanol:água (50:50), e foram injetadas por infusão direta usando uma bomba de infusão com seringa e os espectros escaneados de uma faixa de massas de m/z 50 a 3000 Da, utilizando-se os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 4.5 KV, pressão do gás de nebulização de 0,4 bar e temperatura de 180°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 mostra o cromatograma da Fat-f (A) na concentração de 100 µg/mL e Fat-r (B) na concentração de 30 µg/mL sendo observado que tanto a warifteína quanto a metilwarifteína se encontra nas folhas e nas raízes da planta sendo nas raízes a maior concentração, enquanto a milonina apenas esta presente nas folhas no tempo de retenção de 10,47. Na Fat-raízes (B) surgiu um pico no tempo de retenção de 13,79 que esta coeluinto com outra substância. Este resultado despertou o interesse de se fazer cromatografia em coluna tanto para reisolos os marcadores quanto descobrir novas moléculas.

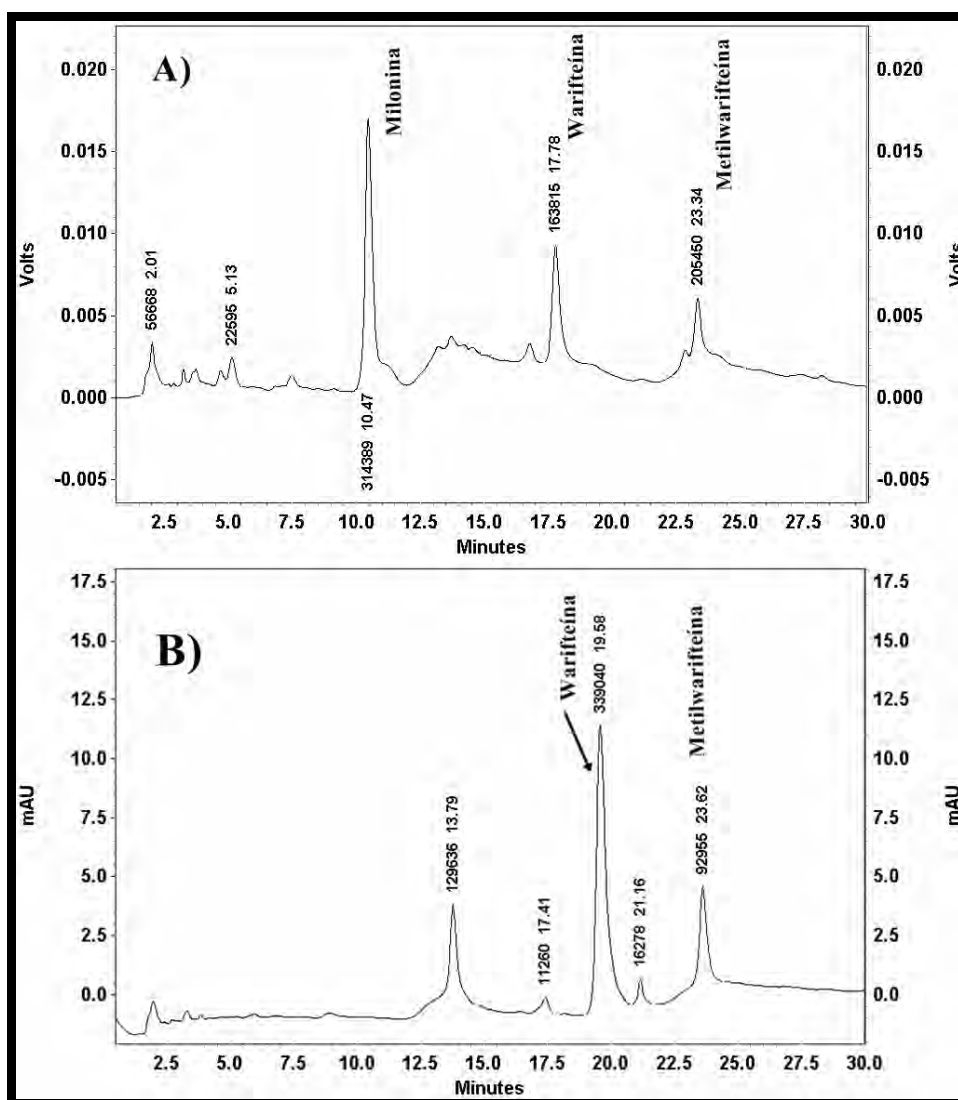


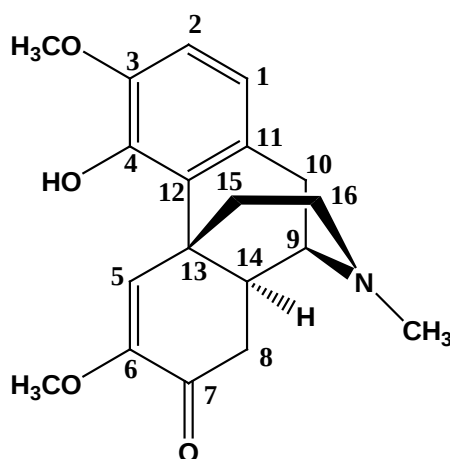
Figura 3: Cromatogramas da Fat-f (A) na concentração de 100 µg/mL e da Fat-r (B) na concentração de 30 µg/mL.

5.1 Dados espectroscópicos

5.1.1 Milonina

O dados obtidos para a milonina foram comparados com os dados da literatura (FREITAS et al, 1995). A Figura 4(A) (pág. 49) mostra o cromatograma obtido com a milonina isolada e purificada na concentração de 50 µg/mL com tempo de retenção de 10,66 min.

P.F. 79-80 °C; IR (KBr) $V_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3431, 2933, 1685, 1614, 1483; EMESI+ m/z 330,1676 (calc. 330,1700); ^1H NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz): δ 2,24 (s, 3H, N-Me), 3,60 (s, 3H, MeO-6), 3,73 (s, 3H, MeO-3), 6,75 (d, 1H, J 8,0 Hz, H-1), 6,89 (d, 1H, J 8,0 Hz, H-2), 8,29 (s, 1H, H-5), 10,75 (br s, 1H, OH), eq. 2,58 (dd, J 17,5, 4,5 Hz, H-8), 2,78 (br d, J 6,0 Hz, H-9), eq. 2,74 (dd, J 17,5, 6,0 Hz, H-10), 2,39 (m, H-14), 2,14 a 2,08 (m, 2H, H-15), 2,41 (m, 1H)/2,37 (m, 1H, H-16), ax 3,61 (dd, J 14,0, 18,5 Hz, H-8), ax 3,08 (d, J 18,0 Hz, H-10); ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 125 MHz): δ 110,4 (C-2), 119,3 (C-1), 124,8 (C-5), 127,7 (C-12), 131,6 (C-11), 145,2 (C-4), 147,0 (C-3), 151,4 (C-6), 193,8 (C=O), 56,9 (C-9), 56,1 (MeO-3), 54,5 (MeO-6), 47,1 (C-16), 42,8 (Me-N), 41,7 (C-14), 40,1 (C-8), 38,3 (C-13), 32,6 (C-15), 28,0 (C-10).

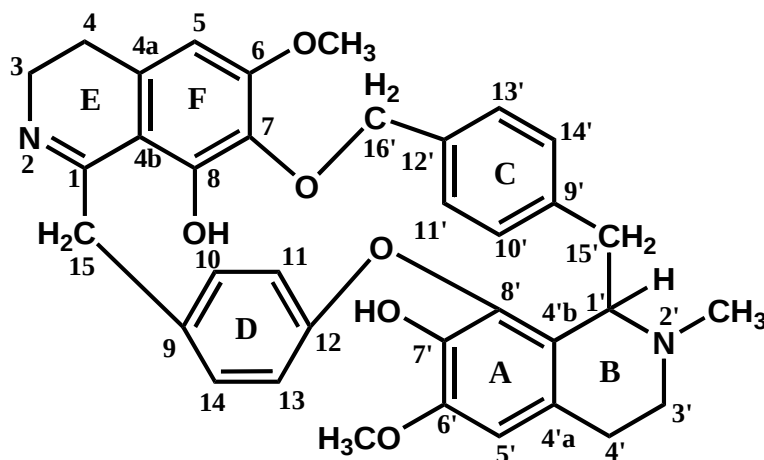


5.1.2 Warifteína

Os dados obtidos para a warifteína foram comparados com os da literatura (MUKHERJEE & KEIFER, 2003). A Figura 4(B) (pág. 49) mostra o cromatograma obtido com a warifteína isolada e purificada na concentração de 50 µg/mL com tempo de retenção de 17,53 min.

P.F. 235-236 °C; IR (KBr) $V_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3487, 2935, 2845, 1610, 1504, 1446, 1301, 1219, 118, 821; EMESI+ m/z 593,2661 (calc. 593,2646); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2,01 (br s, 3H, 2'-NMe), 3,84 (s, 3H, 6'-OMe), 3,91 (s, 3H, 6-OMe), 7,09 (d, 2H, J 10 Hz, H-10'/H-14'), 6,91 (d, 2H, J 10 Hz, H-11'/H-13'), 6,47 (s, 1H, H-5'), 6,20 (s, 1H, H-5), 3,23 (td, J 15,0, 5,0 Hz, 2H, H-1'/H-3), 2,75 (m, 3H, H-3/H-15'), 2,51 (br m, 4H, H-4/H-4'/H-4'/H-15'), 6,58 (d, J 10,0 Hz, 2H, H-11/H-13), 2,91 (m, 2H, H-4'), 5,13 (br m, 2H, H-16'), 6,66 (br d, 2H, H-10/H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 165,5 (C-1), 153,1 (C-6), 153,9 (C-12), 148,0 (C-8), 147,2 (C-6'), 142,8 (C-9'), 138,6 (C-7'), 138,2 (C-8'), 135,4 (C-4a), 132,9 (C-12'), 131,6 (C-9), 130,4 (C-7), 128,6 (C-10/C-14 e C-11'/C-13'), 128,5 (C-10'/C-14'), 124,7 (C-4'b ou C-4'a), 124,4 (C-4'a ou C-4'b),

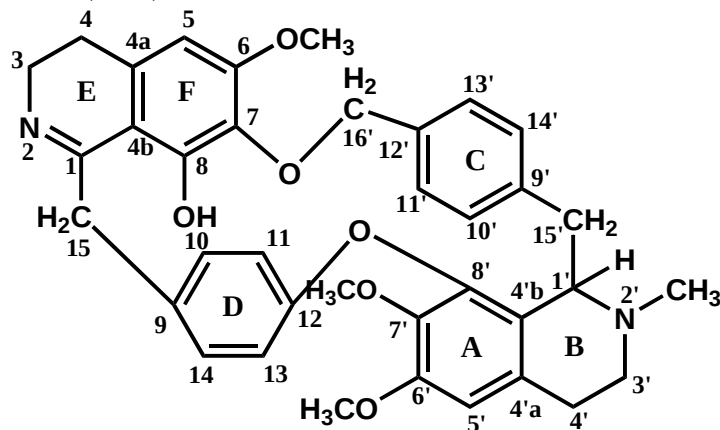
114,1 (C-11/C-13), 109,7 (C-4b), 108,0 (C-5'), 102,9 (C-5), 74,2 (C-16'), 59,1 (C-1'), 56,0 (6'-OMe), 55,6 (6-OMe), 46,0 (C-15), 44,1 (C-3), 43,9 (C-3'), 41,9 (2'-NMe), 39,8 (C-15'), 27,9 (C-4), 23,0 (C-4').



5.1.3 Metilwarifteína

Os dados obtidos para a metilwarifteína foram comparados com os da literatura (MUKHERJEE & KEIFER, 2003). A Figura 4(C) (pág. 49) mostra o cromatograma obtido com a metilwarifteína isolada e purificada na concentração de 50 µg/mL com tempo de retenção de 22,99 min.

P.F. 200-201 °C; IR (KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3435, 2927, 2850, 1608, 1504, 1448, 1300, 1217, 1010, 823; EMESI+ m/z 607,2832 (calc. 607,2803); 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 1,96 (s, 3H, 2'-NMe), 3,72 (s, 3H, 7'-OMe), 3,83 (s, 3H, 6'-OMe), 3,89 (s, 3H, 6-OMe), 6,14 (s, 1H, H-5), 6,51 (s, 1H, H-5'), 5,08 (d, 1H, J 10 Hz, H-16'), 6,64 (d, 2H, J 10 Hz, H-11/H-13), 6,90 (d, 2H, J 5 Hz, H-10/H-14), 6,92 (d, 2H, J 10 Hz, H-11'/H-13'), 7,08 (d, 2H, J 10 Hz, H-10'/H-14'), 3,23 (td, 2H 1H, J 5 Hz, H-1'/H-3), 2,75 (m, 3H, H-3/H-15'), 2,46 (br m, 4H, H-4/H-4'/H-4'/H-15'), 2,91 (br s, 4H2H, H-4'), 5,20 (v br d, 2H, H-16'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ 165,4 (C-1), 154,6 (C-12), 152,9 (C-6), 151,9 (C-6'), 147,9 (C-8), 144,8 (C-8'), 142,5 (C-9'), 140,9 (C-7'), 135,4 (C-4a), 132,7 (C-12'), 131,6 (C-9), 130,1 (C-7), 129,7 (C-4'a ou C-4'b), 128,7 (C-11'/C-13'), 128,6 (C-10/C-14), 128,5 (C-10'/C-14'), 124,9 (C-4'b ou C-4'a), 114,1 (C-11/C-13), 109,4 (C-4b), 108,9 (C-5'), 102,0 (C-5), 73,8 (C-16'), 61,1 (7'-OMe), 59,4 (C-1'), 55,9 (6'-OMe), 55,5 (6-OMe), 46,5 (C-15), 44,7 (C-3), 43,7 (C-3'), 41,6 (2'-NMe), 39,9 (C-15'), 27,7 (C-4), 23,0 (C-4').



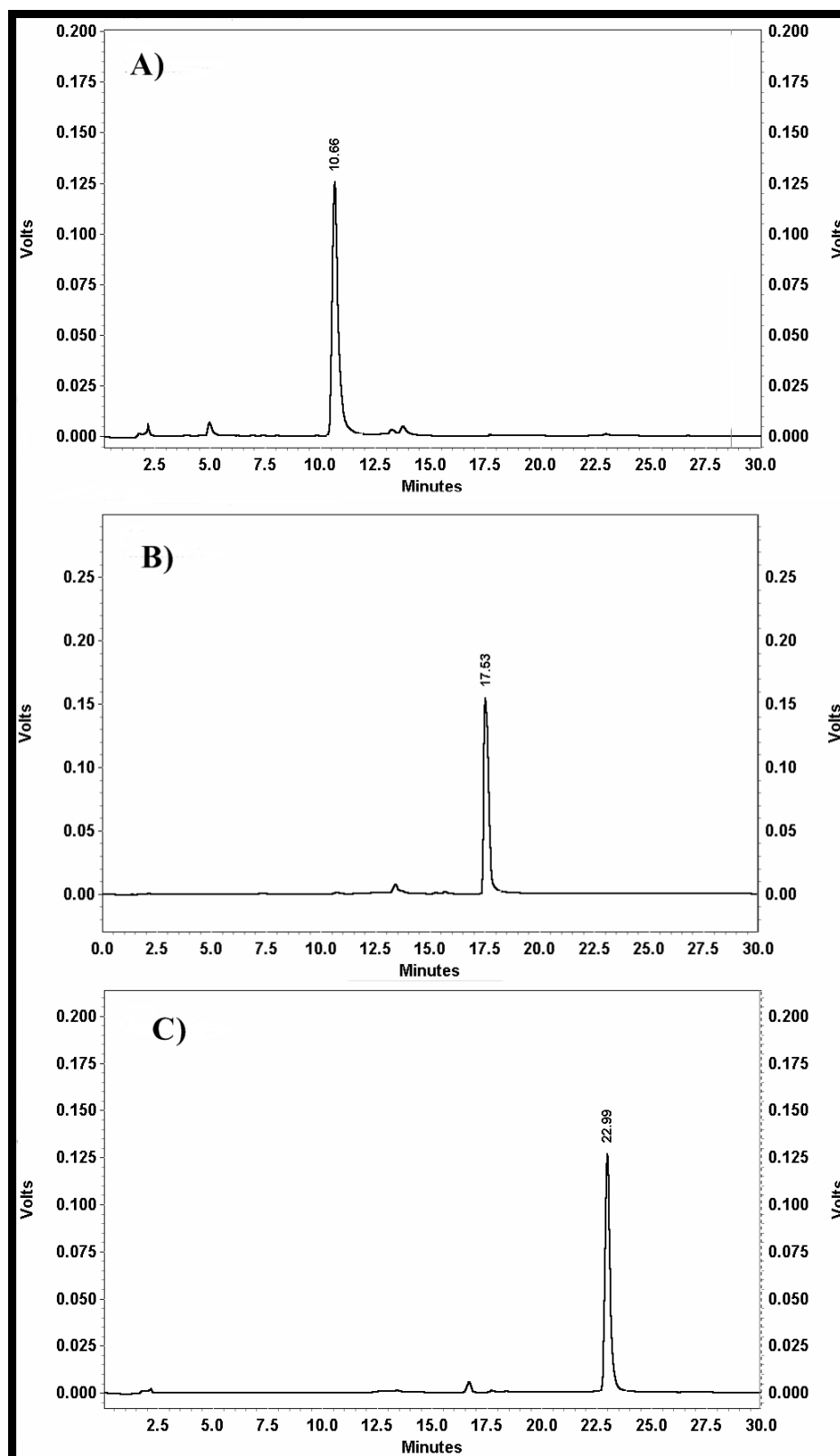


Figura 4: Cromatograma da solução dos padrões a 50 µg/mL de milonina (A), warifteína (B) e metilwarifteína (C) utilizando as condições cromatográficas obtidas na validação do método (Capítulo III)...

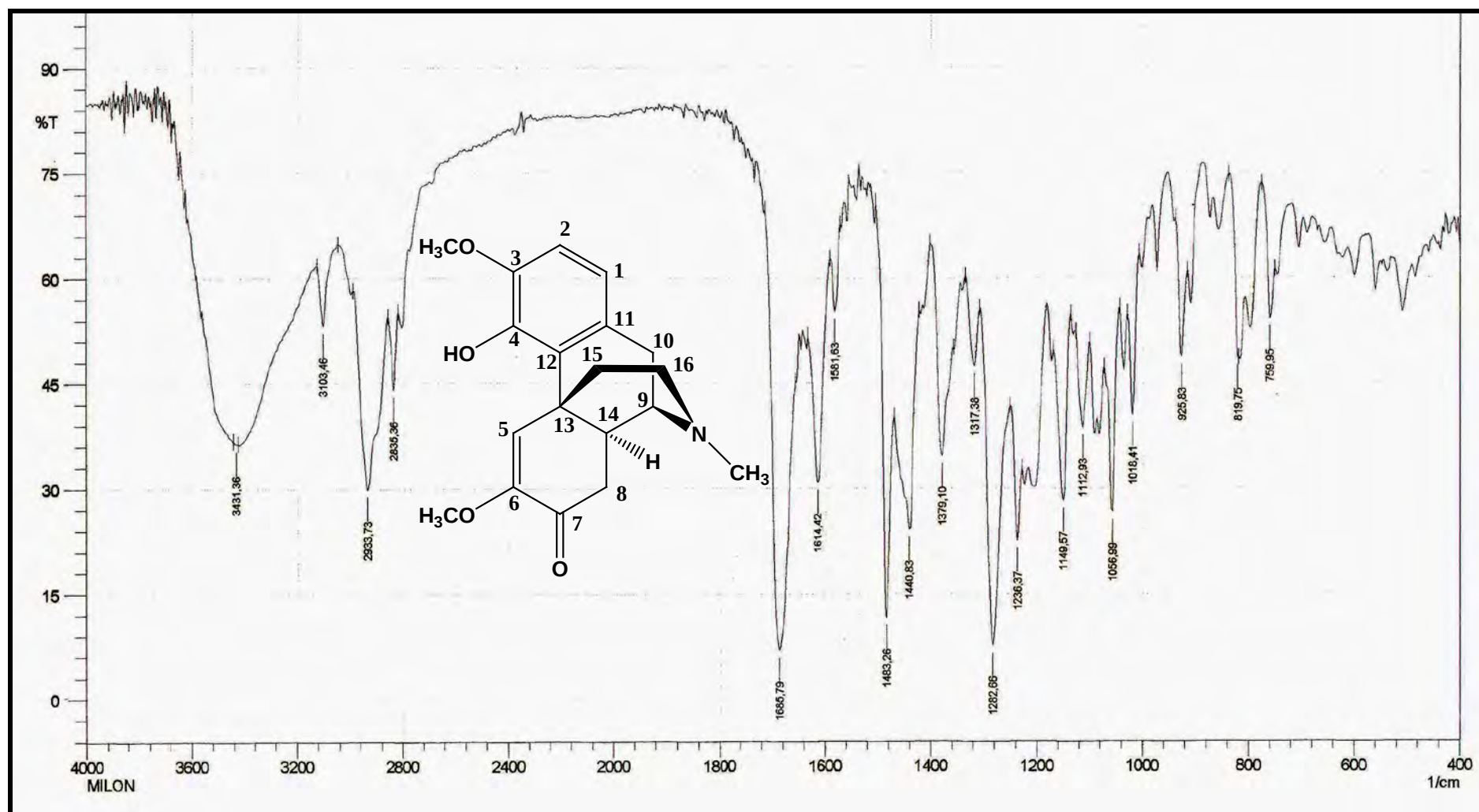


Figura 5: Espectro de infravermelho da milonina em KBr.

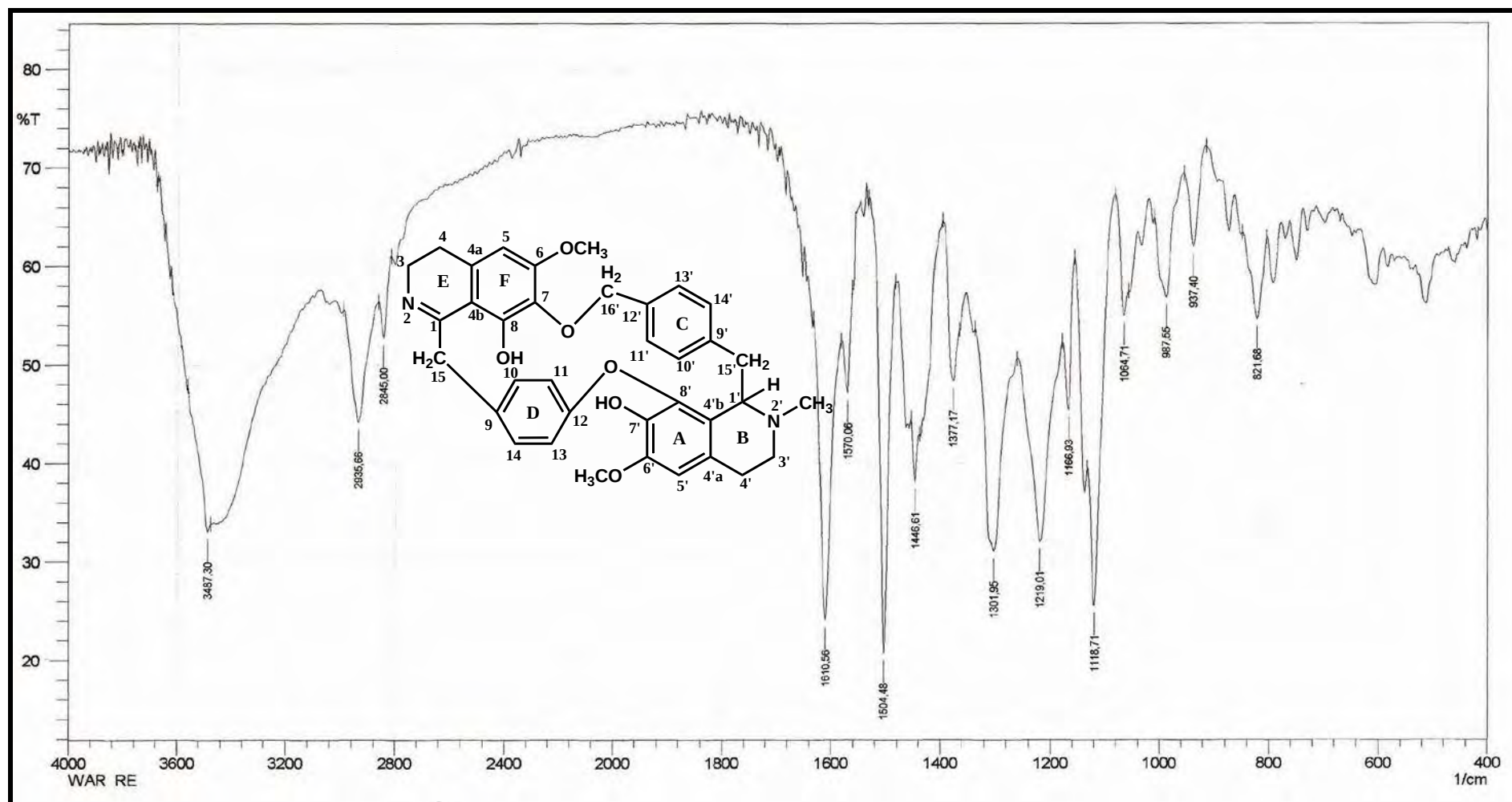


Figura 6: Espectro de infravermelho da warifteína em KBr.

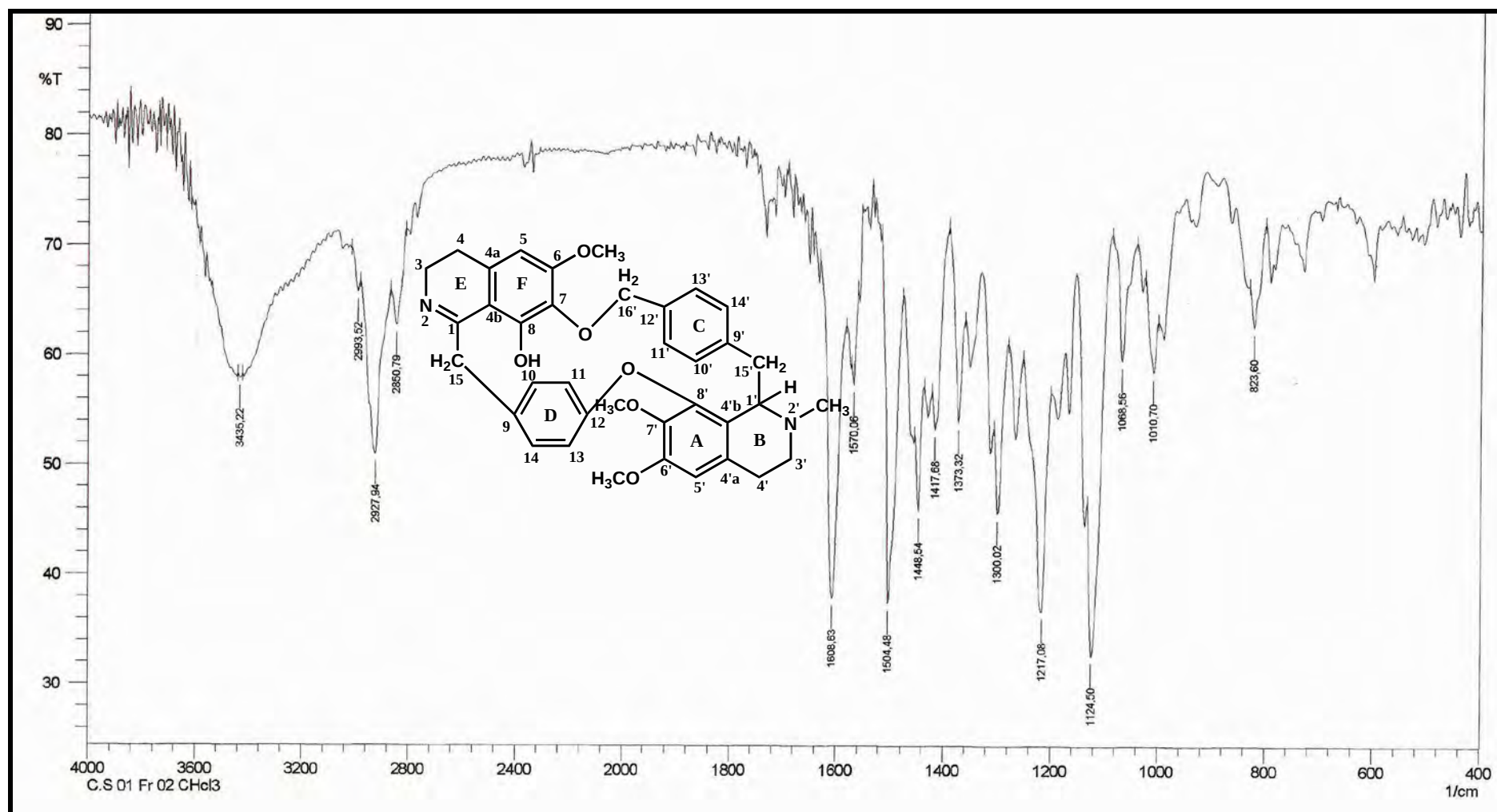


Figura 7: Espectro de infravermelho da metilwarifteína em KBr.

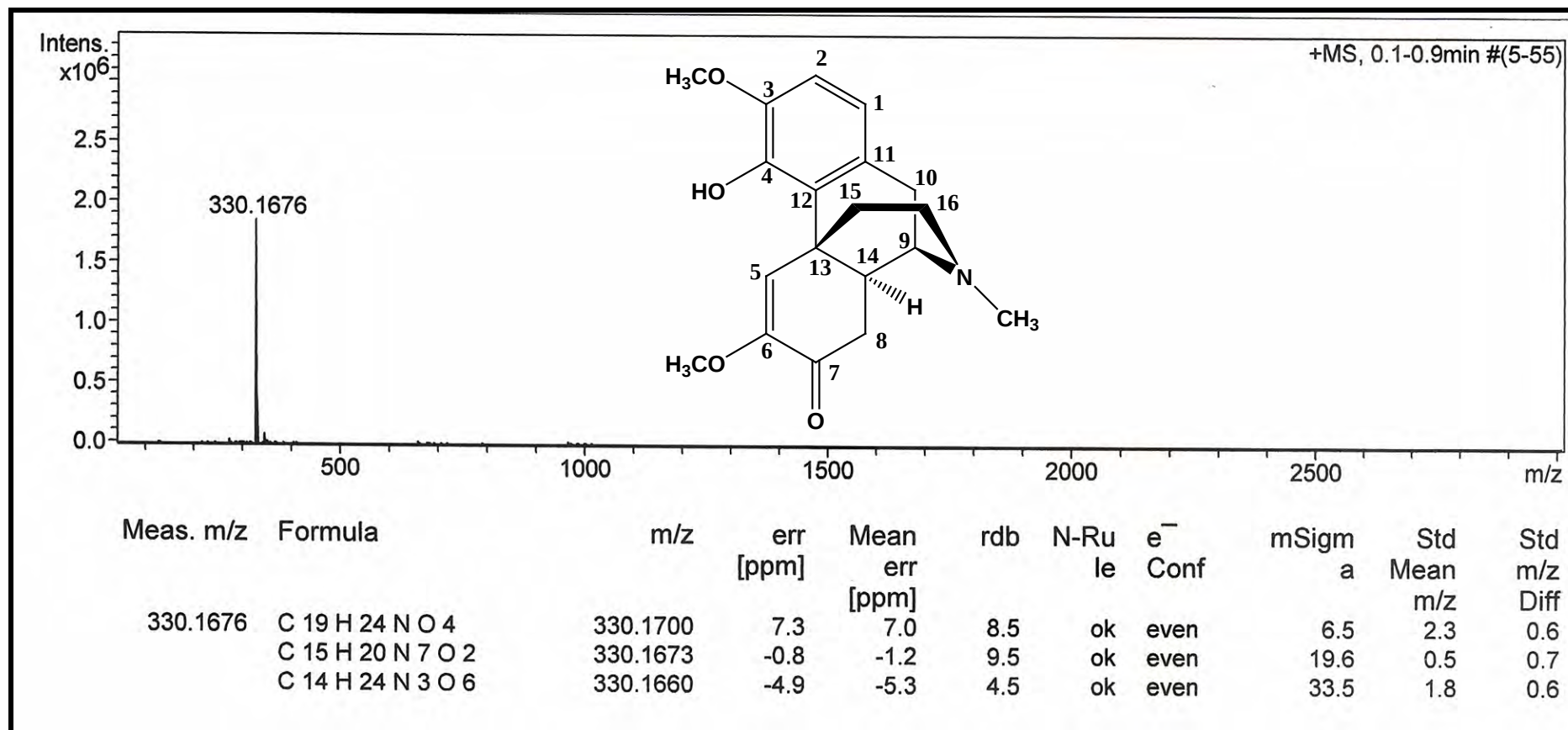


Figura 8: Espectro de massas de alta resolução da milonina.

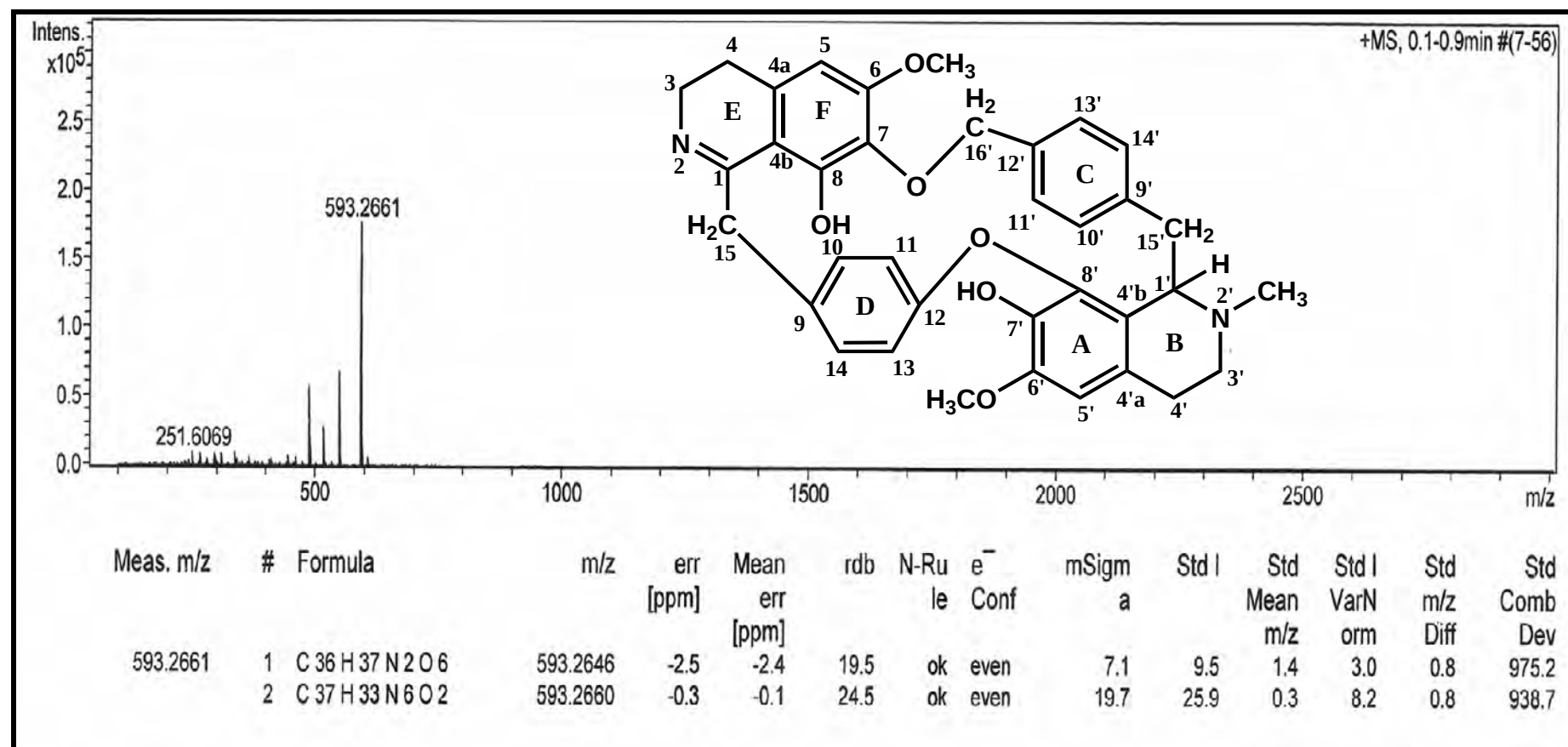


Figura 9: Espectro de massas de alta resolução da warifteína

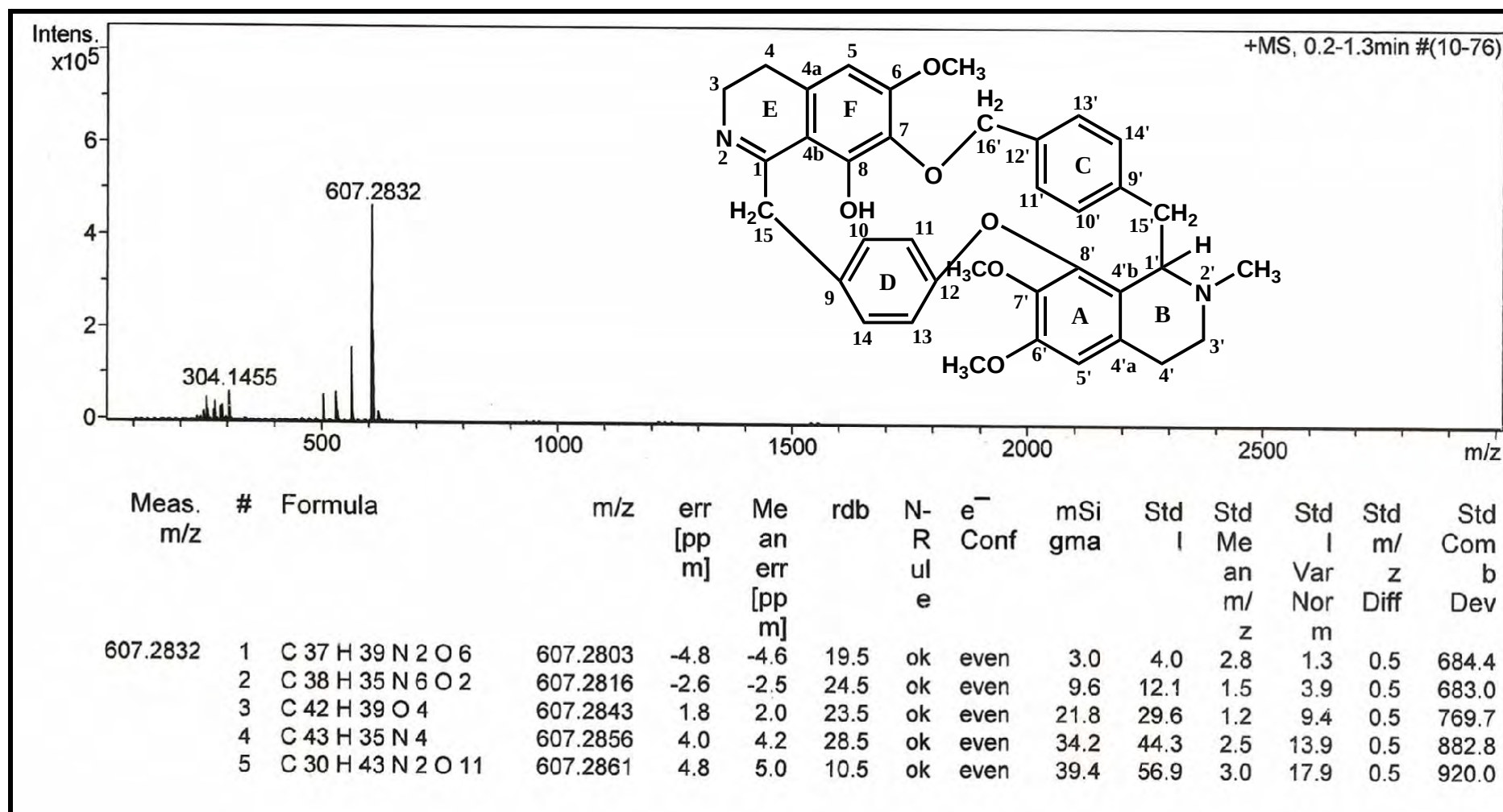


Figura 10: Espectro de massas de alta resolução da metilwarifteína

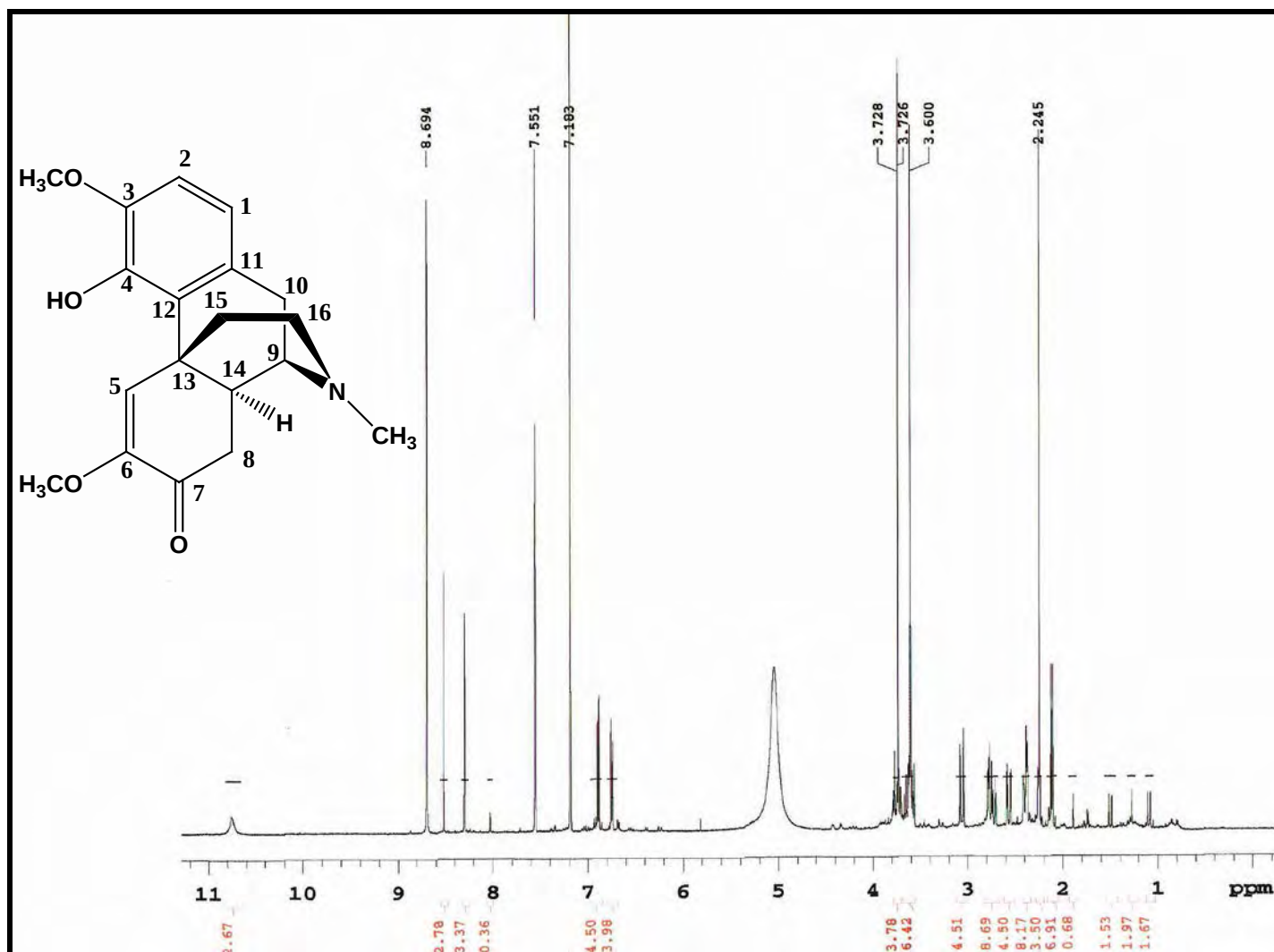


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H da milonina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).

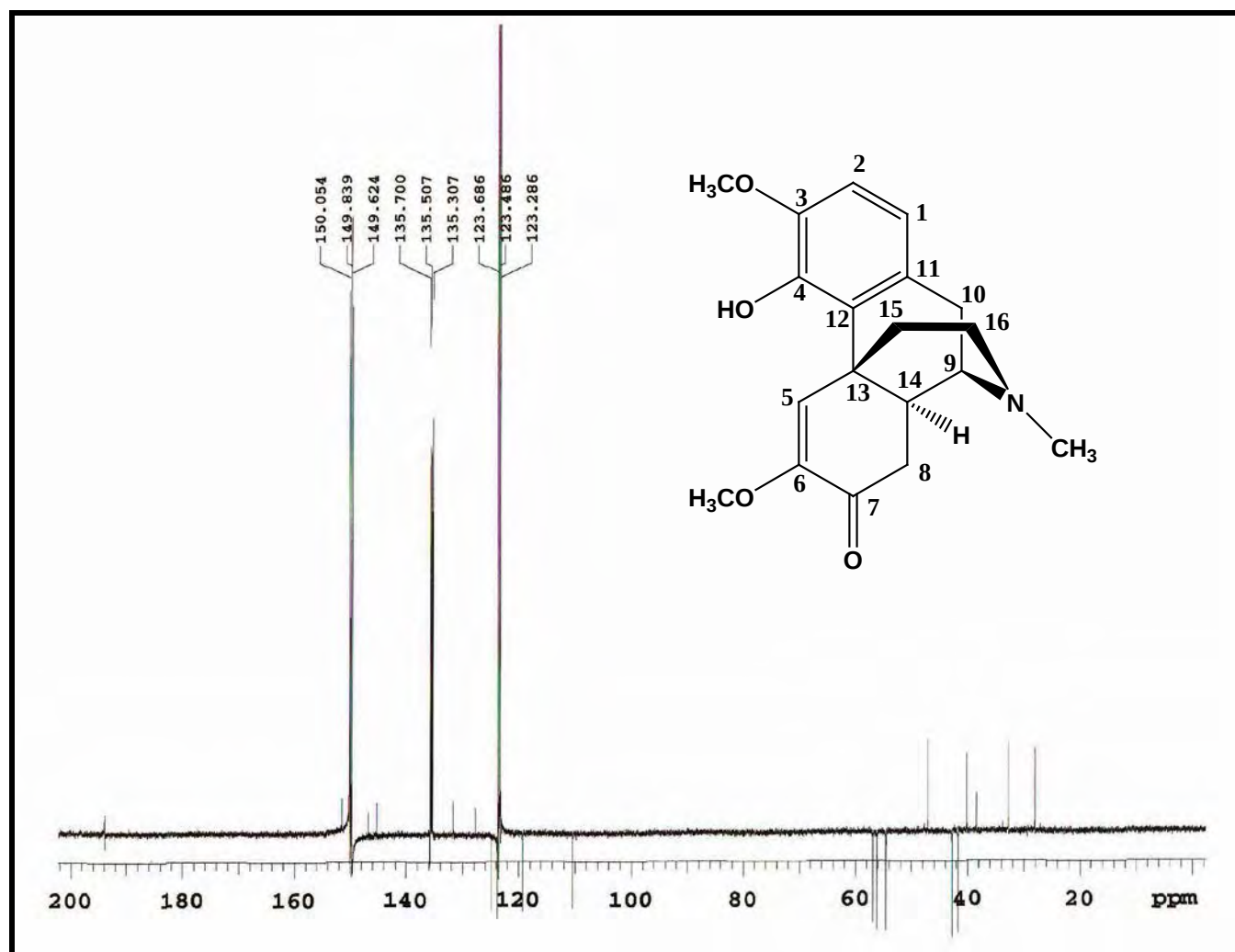
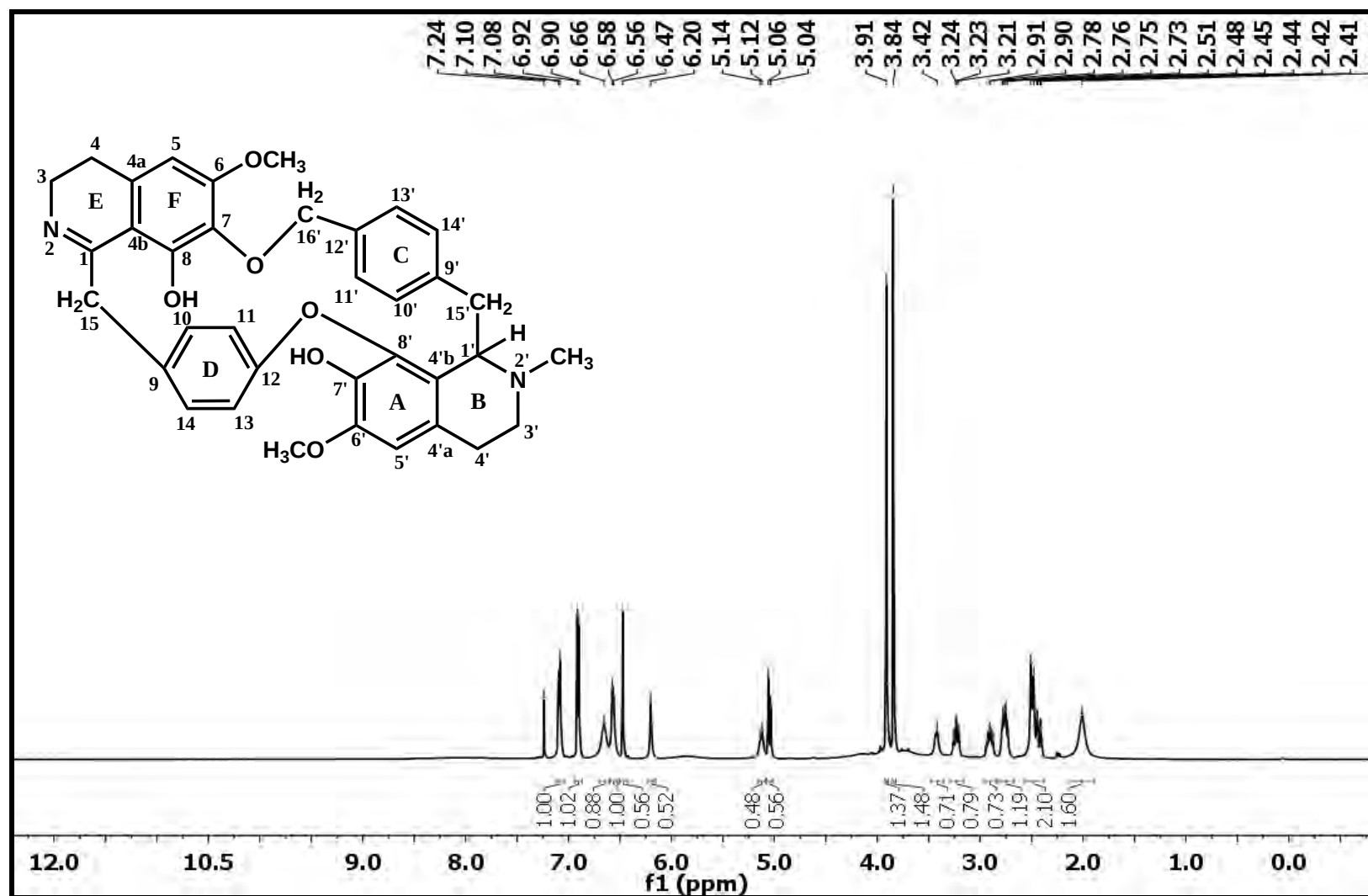


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C -APT da milonina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).

Figura 13: Espectro de RMN de ^1H da warifteína (CDCl_3 , 500 MHz).

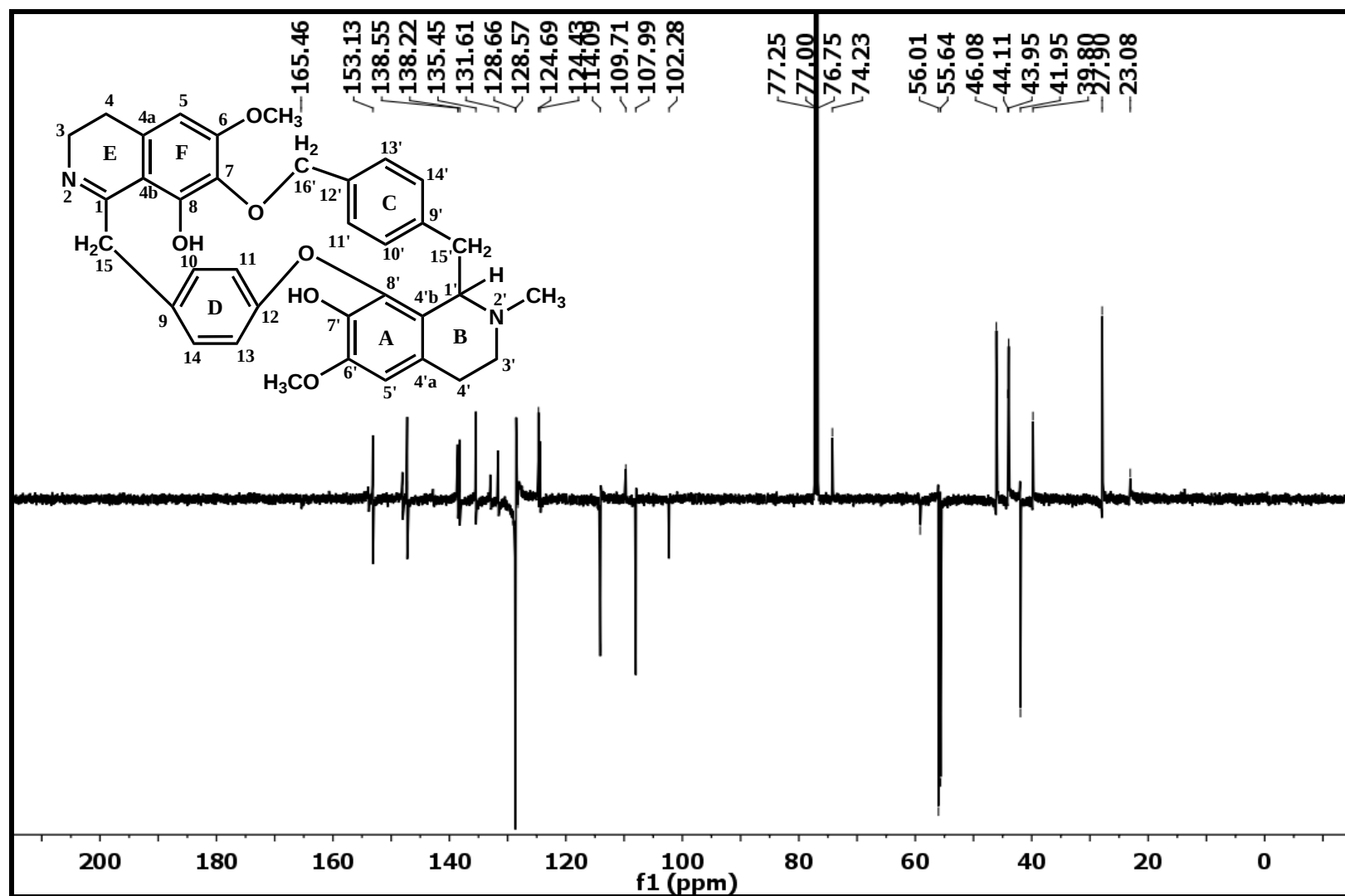
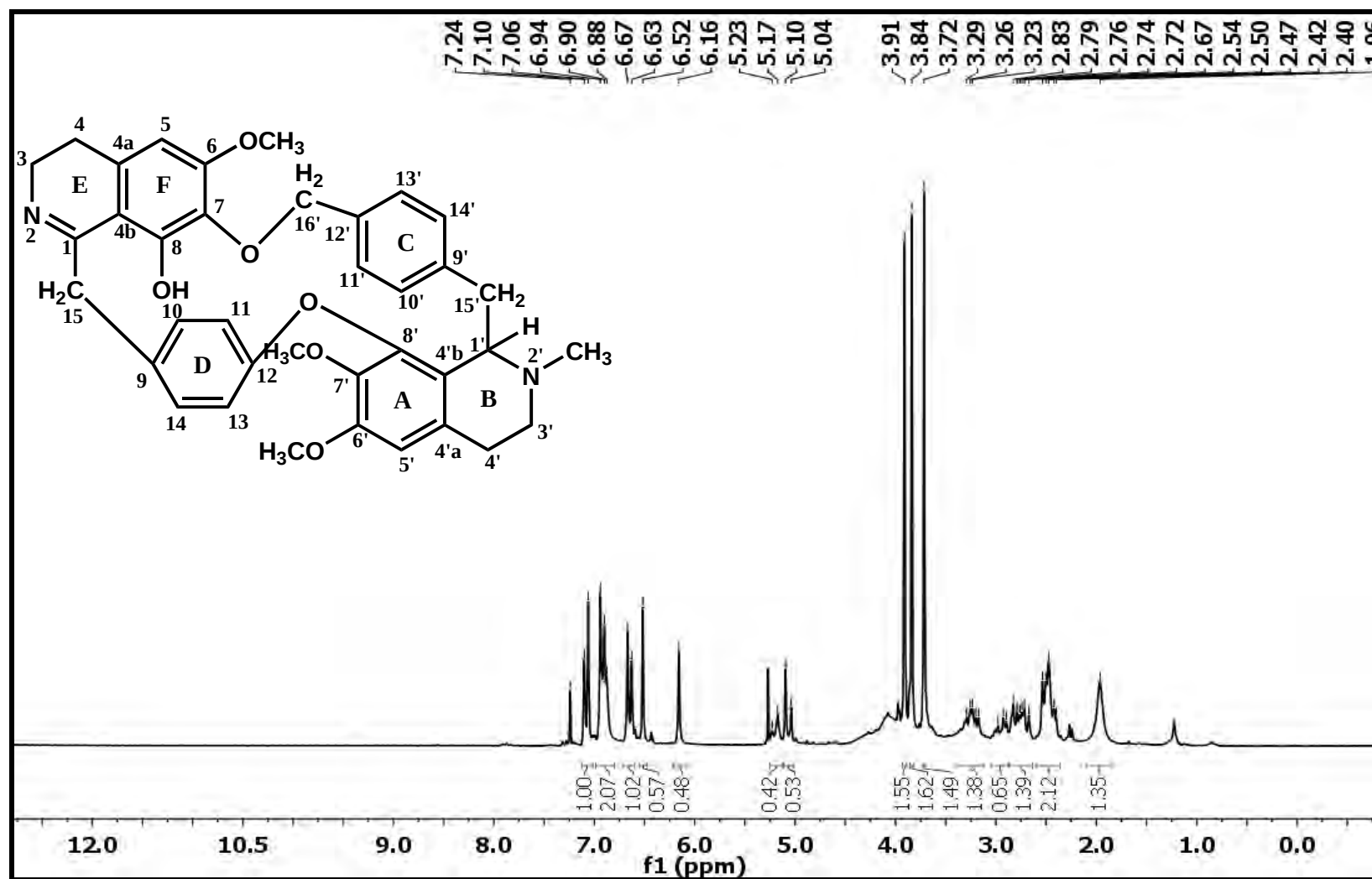


Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C -APT da warifteína (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 15: Espectro de RMN de ^1H da metilwarifteína (CDCl_3 , 500 MHz).

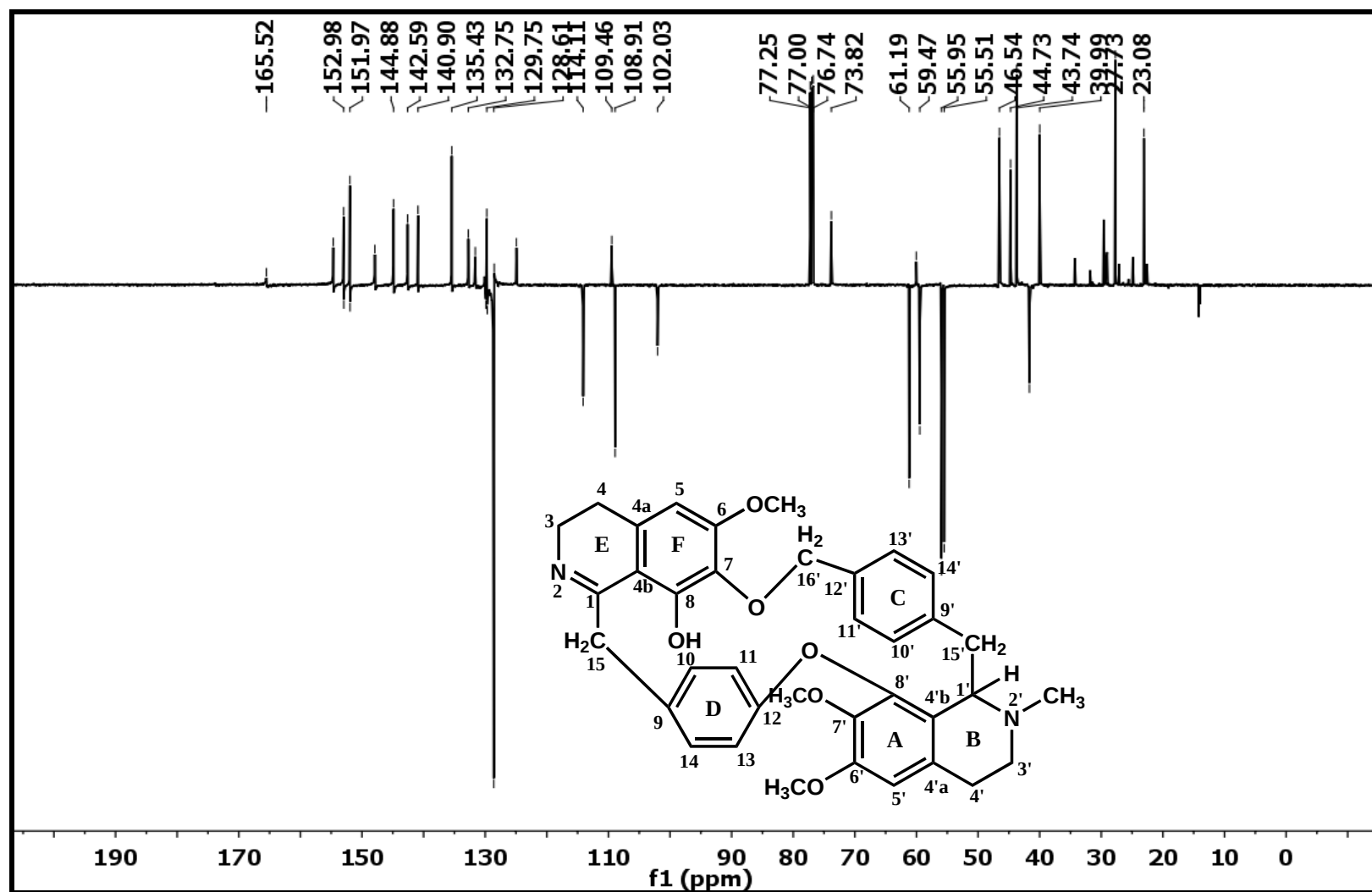
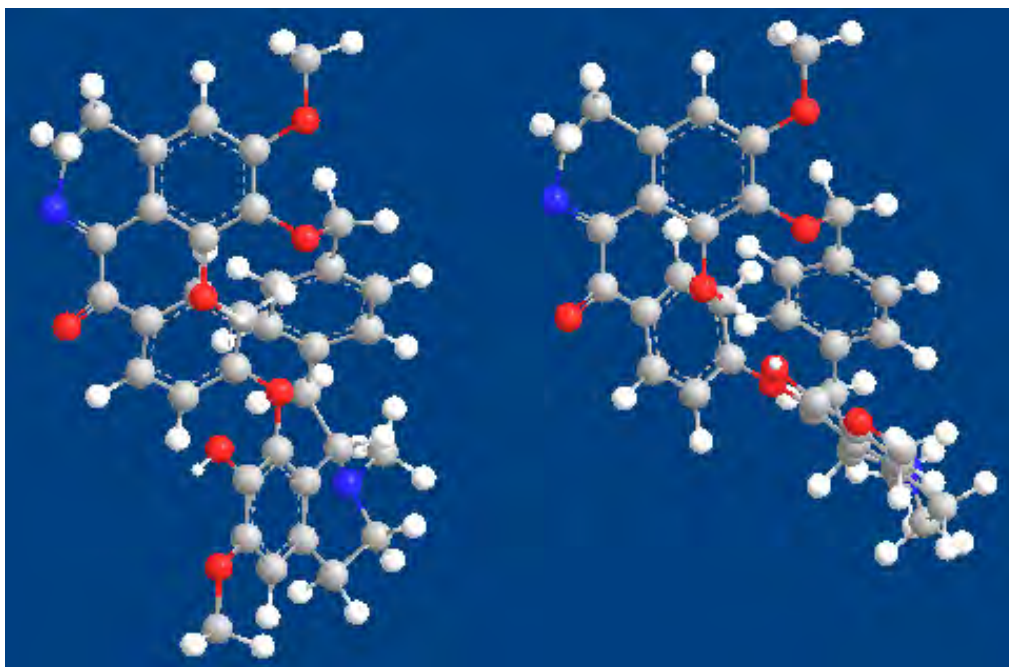


Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C -APT da metilwarifteína (CDCl_3 , 500 MHz).



Capítulo II

Desenvolvimento do método

6. INTRODUÇÃO

6.1 Princípios da Cromatografia

A técnica da cromatografia foi descoberta em 1906 pelo botânico italiano naturalizado russo Mikahail Tswett, porém não foi muito utilizada até os anos 30. Tswett separou pigmentos de plantas (clorofilas e carotenóides) adicionando um extrato de folhas verdes em éter de petróleo sobre uma coluna com carbonato de cálcio em pó em um tubo de vidro vertical. Enquanto a solução percolou através da coluna, os componentes individuais da mistura migraram para baixo em diferentes velocidades e então a coluna apresentou-se marcada com gradientes horizontais de cores. A esse gradiente deu-se o nome de cromatograma (COLLINS *et al.*, 1990).

A cromatografia funciona pelo fato das moléculas apresentarem polaridades em comum e tenderem a se atrair mutuamente. Uma molécula polar possui uma região rica em elétrons (-) e uma outra região que é pobre em elétrons (+). Moléculas polares são unidas por forças de atração entre cargas opostas de átomos diferentes. Por exemplo, as moléculas da água possuem regiões ricas em elétrons nos átomos de oxigênio e pobres em elétrons nos átomos de hidrogênio.

Cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: uma fase estacionária e outra móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária eluindo consigo os diversos componentes da mistura. De maneira mais completa, a técnica se baseia no princípio da adsorção seletiva (PERES, 2002).

Estas diferenças no gradiente de migração dependerão das características físico-químicas da fase móvel, da fase estacionária e também dos analitos (NASCIMENTO, 2004). A Figura 17 (pág. 63) mostra um processo de separação por cromatografia de forma simples.

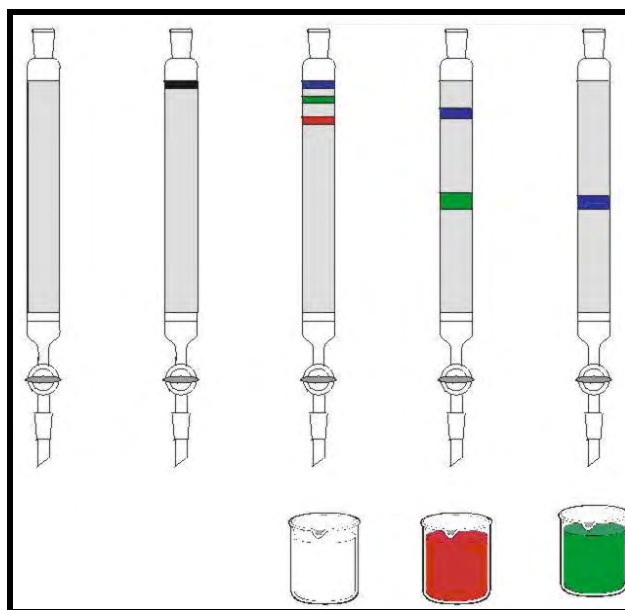


Figura 17: Processo de separação cromatográfica de três analitos em função do tempo (<http://lac.chem.polimi.it/img/big/figura1.jpg>).

Os componentes da amostra da Figura 17 são separados pela distribuição entre as duas fases: móvel e estacionária. Estes componentes são introduzidos no tempo zero, e são eluídos pela fase móvel até entrar em contato com a fase estacionária, na qual eles se distribuem ou particionam-se entre as duas fases dependendo das suas afinidades relativas com as mesmas como determinado por suas estruturas moleculares e pelas forças intra-moleculares.

Existem quatro principais tipos de cromatografia: cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. A seleção do tipo de cromatografia adequada depende do material a ser isolado (PERES, 2002).

6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Segundo CIOLA (1998) o HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), é uma técnica que emprega um conjunto de equipamentos especiais, que poderão diferir em características e grau de automação (Figura 18, pág. 64). Os aparelhos empregados para realizar a cromatografia

a líquido são chamados de cromatógrafos a líquido. Uma das principais características da técnica é a utilização de colunas empacotadas com suportes a base de sílica pelicular, que possui diâmetros de 3-5 μm , o que garante uma elevada área superficial para a fase estacionária e colunas com elevada eficiência.

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência se caracteriza por ter, em sua configuração básica, os seguintes componentes:

- 1 Reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel;
- 2 Sistema de bombeamento da fase móvel;
- 3 Sistema de introdução da amostra (injetor);
- 4 Coluna cromatográfica de separação;
- 5 Sistema de detecção (UV, por exemplo)
- 6 Sistema de registro e tratamento de dados.

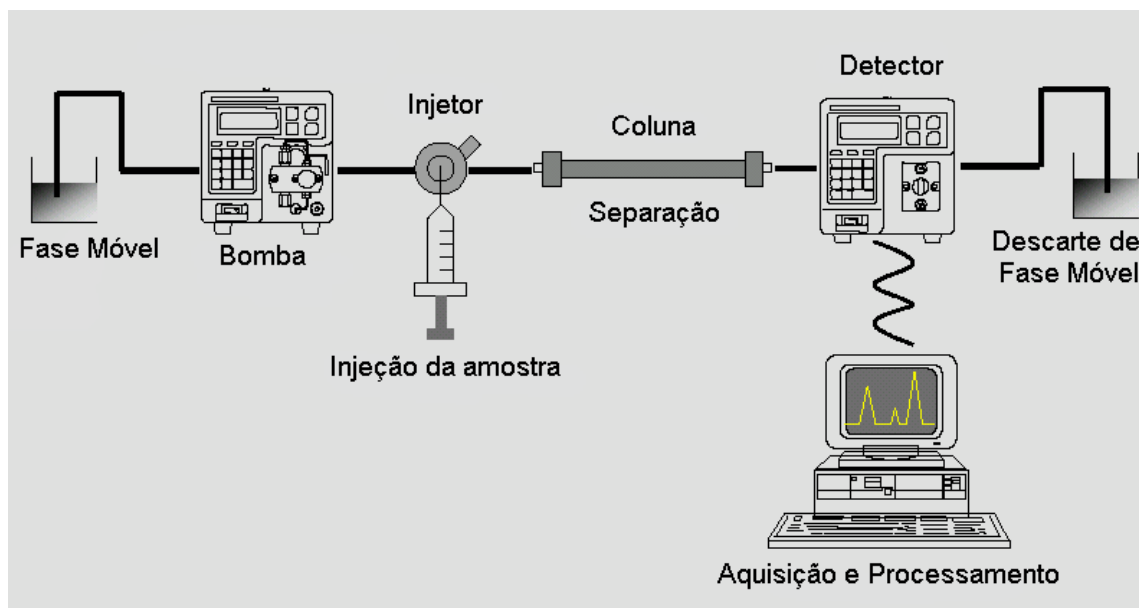


Figura 18 - Diagrama esquemático de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

O solvente (fase móvel) encontrado no reservatório é bombeado com o auxílio da bomba através do sistema de introdução da amostra até a coluna cromatográfica que pode estar situada dentro de um termostato. A separação dos componentes da mistura é

efetuada de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e a natureza dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, que detecta alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é registrado e tratado matematicamente por um processador, obtendo-se um gráfico que se chama de cromatograma.

6.3 Desenvolvimento de métodos cromatográficos em CLAE

A cromatografia a líquido pode ser empregada na análise dos mais variados materiais e da sua natureza vão depender as atividades do analista em efetuar com eficiência, precisão e exatidão a análise cromatográfica. Para se analisar com eficiência a amostra é necessária conhecer o máximo possível as propriedades dos seus componentes como: estrutura química, grupos funcionais, polaridade, solubilidade, concentração, pH e PK dos compostos objeto de análise (CIOLA, 1998).

Durante o processo de desenvolvimento do método algumas considerações devem ser seguidas como: tempo de desenvolvimento do método, o tempo de execução máximo para a análise, o número esperado de amostras por semana, a complexidade da mistura, a estrutura do analito principal (propriedades físico-químicas), possíveis vias de degradação (ex., oxidação, hidrólise, desidratação, fotólise, termólise, racemização) e se o analito ou analitos são ionizáveis (KASAKEVICH, 2007).

Outra consideração importante no desenvolvimento do método é o pré-tratamento da amostra e sua detecção. As amostras que podem potencialmente ser analisadas por CLAE podem ter várias apresentações:

- Amostras prontas para injeção;
- Soluções que requerem diluições, tamponação, adição de um padrão interno, ou outras manipulações volumétricas;
- Sólidos que devem ser primeiro dissolvidos ou extraídos;
- Amostras que requerem um pré-tratamento para removerem interferentes e proteger a coluna ou equipamento de danos.

Obviamente que a injeção direta da amostra é preferível pela conveniência e uma melhor precisão, no entanto, muitas amostras para serem analisadas em CLAE precisam ser pesadas e diluídas antes da injeção. Os melhores resultados são obtidos quando o solvente utilizado para solubilizar a amostra é a própria fase móvel, já que este procedimento diminui ruídos na linha de base e outros problemas, como a assimetria da banda cromatográfica. Algumas amostras necessitam de um pré-tratamento para remover seus interferentes antes de serem injetadas no CLAE. Isto significa que é muito importante conhecer a natureza da matriz da amostra e as concentrações dos vários analitos. Em muitos casos o desenvolvimento de um método adequado para o pré-tratamento da amostra pode ser mais complicado do que obter uma boa separação (SNYDER *et al.*, 1997).

Antes da primeira amostra ser injetada durante o desenvolvimento do método, é necessário ter a certeza de que o detector selecionado irá ser sensível a todos os componentes de interesse da amostra. Detectores de UV com comprimentos de onda variável normalmente são a primeira escolha, por causa da sua conveniência e aplicabilidade para várias amostras. Por esta razão, informações sobre o espectro de UV pode ser uma importante ajuda para o desenvolvimento do método. Espectros de UV podem ser encontrados na literatura, estimados pela estrutura química dos componentes da amostra de interesse, medidos diretamente (se a substância pura estiver disponível), ou obtidos durante a separação em CLAE por meio do detector de arranjo de fotodiodos (PDA). Quando a resposta do UV da amostra estiver inadequada, outros detectores são disponíveis (fluorescência, eletroquímico, etc.), ou a amostra pode ser derivatizada para melhorar a detecção (SNYDER *et al.*, 1997).

A estratégia recomendada para escolher as condições iniciais na primeira separação é classificar a amostra em comum ou especial. São consideradas amostras comuns misturas de moléculas pequenas (<2000 Da) que podem ser separadas usando condições iniciais mais ou menos padronizadas. Amostras especiais necessitam de colunas e condições diferenciadas para separarem-se. Amostras comuns podem ser classificadas como neutras ou iônicas. Amostras iônicas formam compostos ácidos, básicos, anfóteros e sais orgânicos. Se a amostra é neutra, normalmente não é necessário usar fases móveis tamponadas ou adicionadas de aditivos, como reagente par iônico ou aminas. Amostras ácidas ou básicas comumente requerem a adição de tampão na fase móvel. Para amostras básicas, colunas de fase reversa são recomendadas e a adição de aminas na fase móvel pode ser benéfica (COLLINS *et al.*, 2006).

Uma das bases da corrida exploratória inicial é o tipo de eluição que pode ser isocrática ou através de eluição por gradiente, disponível em muitos sistemas de CLAE. Neste ponto também pode ser aparente que condições típicas de fase reversa podem causar retenção insuficiente da amostra, sugerindo o uso de cromatografia por pareamento iônico ou cromatografia de fase normal. Alternativamente, a amostra pode estar retida fortemente com 100% de acetonitrila na fase móvel, sugerindo o uso de cromatografia de fase reversa não aquosa (NARP) ou com fase normal. Uma alternativa para a separação inicial isocrática é o uso de eluição em modo gradiente. Há várias vantagens para o uso inicial de um gradiente, como a possibilidade de determinar se a eluição isocrática ou por gradiente é a melhor escolha, e estimar a melhor força do solvente para a próxima tentativa (isocrática) de separação. Uma separação inicial por gradiente é também vantajosa para o desenvolvimento do método desde que mostre a melhor resolução da amostra que irá ser obtida por separação isocrática com um solvente forte (SNYDER *et al.*, 1997).

Separação ou resolução é o requerimento primário em análises quantitativas por CLAE. Geralmente, para amostras que contém cinco ou menos componentes, a resolução da linha de base ($R_s > 1,5$) pode ser facilmente obtida para os picos de interesse. Este nível de resolução favorece um máximo de precisão nos resultados. A resolução diminui durante o tempo de vida da coluna e pode variar de dia para dia com pequenas flutuações nas condições de separação. No entanto, valores de $R_s = 2$ ou maiores deverá ser a meta para o desenvolvimento do método para misturas simples. Tal resolução irá favorecer tanto os ensaios de precisão, quanto de robustez do método. Amostras que contém dez ou mais componentes irão dificultar a separação, e aqui a meta da separação deverá ser relaxada para $R_s > 1,0$ a $1,5$ (SNYDER *et al.*, 1997).

7. Material e métodos

7.1 Reagentes e materiais

- Metanol grau HPLC, MERCK;
- Álcool etílico 95% P.A-ACS (Quimex);
- Trietilamina, (MERCK);
- Água purificada (Elga Purelab Option-Q);
- Filtros com 0,45 µm de diâmetro de poro;
- Coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5µm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência constituído de uma bomba LC-10 ADvp, detector SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14A, todos da Shimadzu.

7.2 Escolha do comprimento de onda

Para escolha do comprimento de onda foi preparado uma solução com a mistura dos marcadores a 100 µg/mL e injetado em CLAE/DAD. Os comprimentos de onda máximo dos alcalóides milonina, warifteína e metilwarifteína foram selecionados usando o modo “scan 2D” do detector de arrando de diodos com faixa de varredura de 200 a 800 nm e analisados os espectros de UV simples de cada marcador.

7.3 Escolha do fluxo e da concentração da fase móvel

Para escolha do fluxo e da fase móvel a ser utilizada, foi preparada uma solução com a mistura dos marcadores a 100 µg/mL e esta foi analisada utilizando diferentes concentrações de metanol em água (com 0,05% de trietilamina) em modo gradiente. A fase móvel e fluxo escolhido foram aqueles que propiciaram a eluição e separação completa entre milonina, warifteína e metilwarifteína com um valor de fator de retenção adequado ($0,5 < k < 25$) e com uma pressão no sistema adequada (abaixo de 180 Kgf).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Escolha do comprimento de onda

A Figura 19 mostra os espectros de ultravioleta (UV) de forma sobreposta da milonina, warifteína e metilwarifteína obtidos na concentração de 100 µg/mL a partir da injeção dos padrões em CLAE/DAD. A faixa de comprimento de onda que abrange o λ máximo dos três marcadores que fica entre 200 e 225 nm foi descartada por ser uma região de baixa seletividade espectral. O comprimento de onda escolhido foi de 278 nm por ser uma região de boa seletividade espectral em relação a possíveis interferentes e por estar entre o λ máximo da warifteína (282 nm) e o da metilwarifteína (279 nm) e na subida λ máximo da milonina. Foi descartado o λ máximo da milonina por estar em cima do decaimento dos espectros de UV da warifteína e da metilwarifteína.

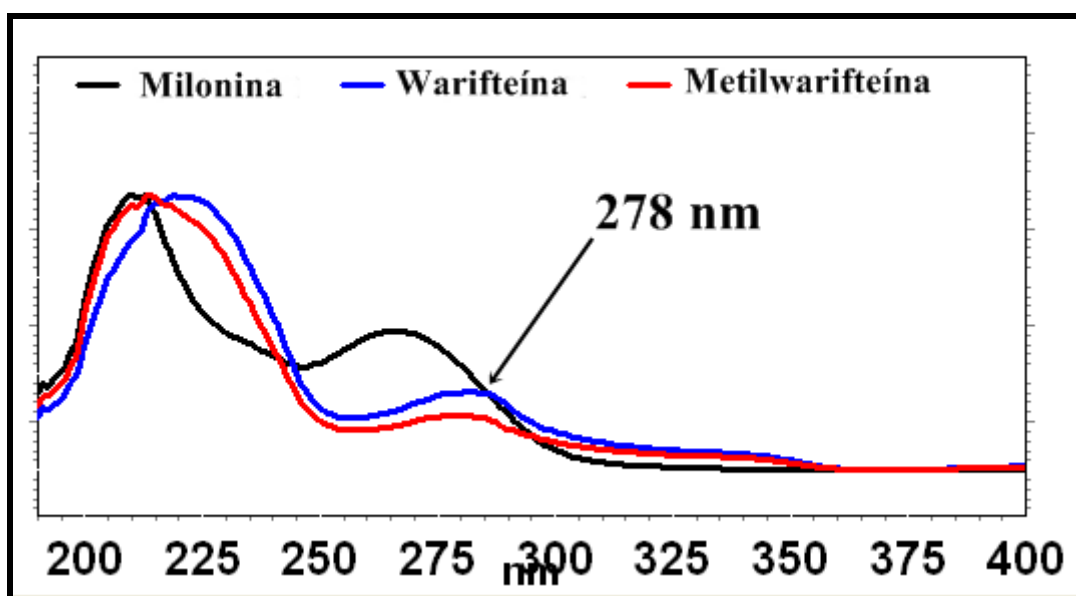


Figura 19: Espectros de UV simples mostrando λ máximos para a milonina, warifteína e metilwarifteína.

8.2 Escolha do fluxo e da concentração da fase móvel

A Figura 20 (pág. 70) mostra o cromatograma obtido com a injeção de 100 µg/mL da mistura dos padrões a um fluxo de 1 mL/min. com fase móvel 0,05% (Et)₃NH₂ aq. (A) :MeOH (B) inicial em modo gradiente de: 0-10 min (10%), 10-15 min. (30%), 15-25 min. (50%), 25-30 min (70%), λ máximo de 278 nm e coluna C₁₈ em CLAE/DAD. Com estas concentrações iniciais mais baixas de metanol os padrões não eluíram, sendo necessário aumentar a concentração do solvente.

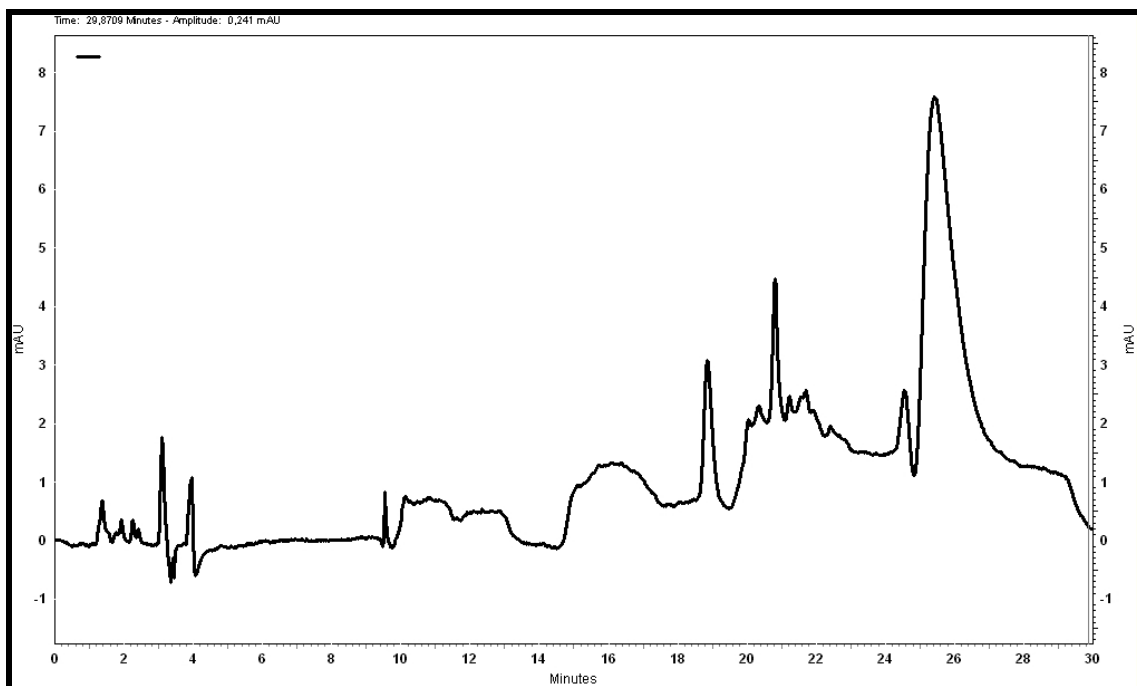


Figura 20: Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-10 min (10%), 10-15 min. (30%), 15-25 min. (50%), 25-30 min (70%); $\lambda = 278$ nm; coluna C₁₈.

A Figura 21 (pág. 71) mostra o cromatograma obtido com a injeção da mistura dos padrões na mesma concentração que a anterior e cuja fase móvel aumentou de 10% para 60% inicialmente ficando com o seguinte gradiente: 0-5 min. (60%), 5-10 min. (90%), 10-25 min. (95%), 25-30 min (60%). Como pode ser observado as substâncias eluíram com estas concentrações mais altas, porém estão coeluído, principalmente warifteína (WAR) e metilwarifteína (MWAR) devido a alta concentração do solvente e conseqüentemente sua força.

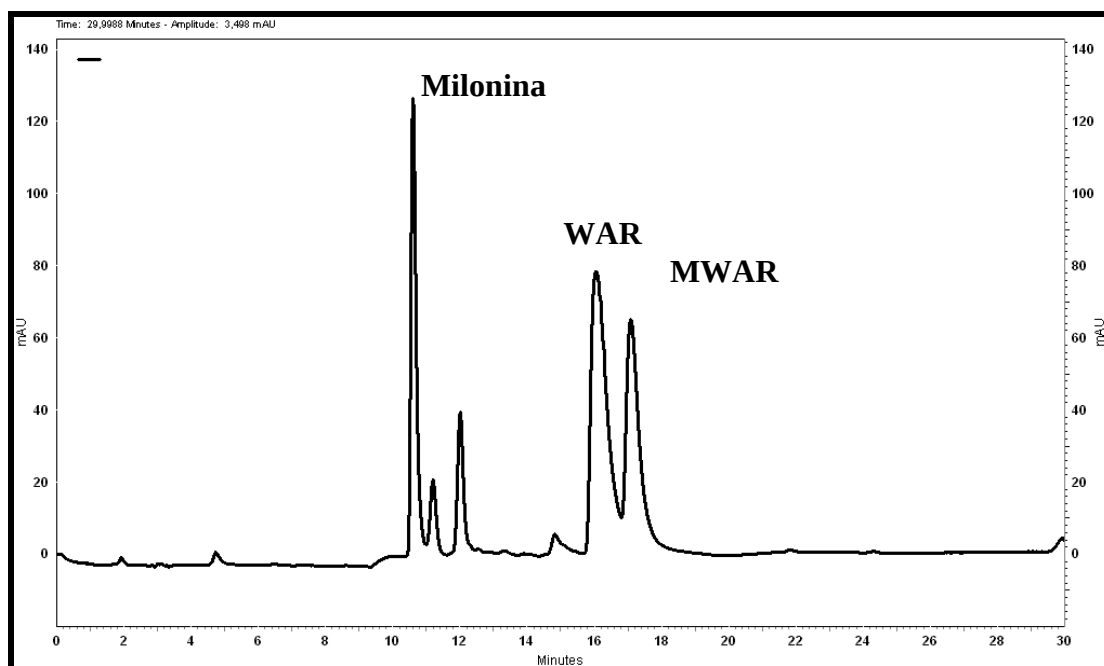


Figura 21: Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-5 min. (60%), 5-10 min. (90%), 10-25 min. (95%), 25-30 min (60%), %; $\lambda = 278$ nm; coluna C_{18} .

O cromatograma da Figura 22 foi obtido com o seguinte gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (70%), 15-25 min. (75%), 25-30 min. (60%). Como se pode observar foram eluídos apenas milonina e warifteína não sendo eluído a metilwarifteína.

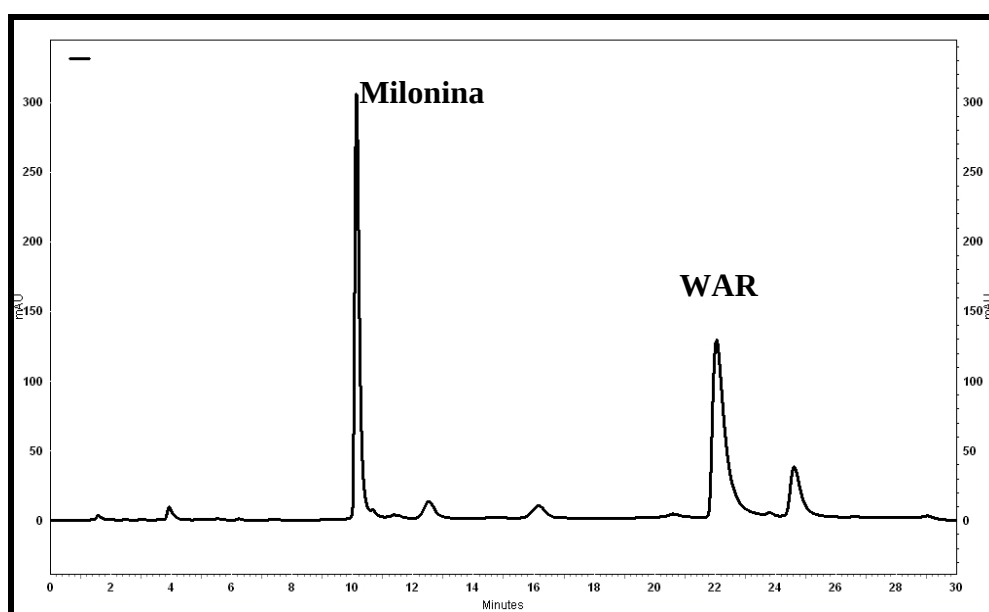


Figura 22: Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL. Gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (70%), 15-25 min. (75%), 25-30 min. (60%); $\lambda = 278$ nm; coluna C_{18} .

A Figura 23 demonstra o cromatograma com o seguinte gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (78%), 25-30 min (60%). Com esse gradiente as três substâncias foram separadas e os picos ficaram bem resolvidos, se obtendo, portanto, êxito na separação.

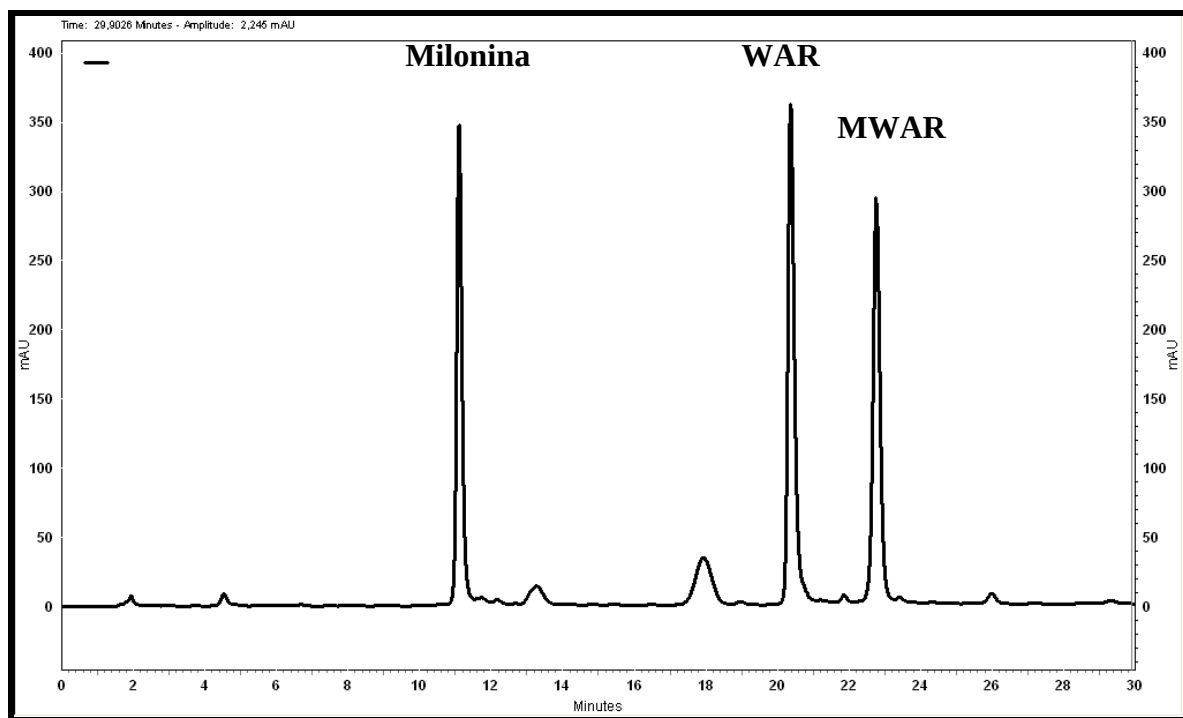


Figura 23: Cromatograma da mistura dos padrões a 100 $\mu\text{g/mL}$. gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (78%), 25-30 min. (60%). $\lambda = 278 \text{ nm}$; coluna C_{18} .

Após os ajustes necessários o resultado final para o desenvolvimento do método foi de uma fase móvel de 0,05% $(\text{Et})_3\text{NH}_2$ aq. (A) :MeOH (B) em modo gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (80%), 25-30 min (60%), tempo de corrida de 30 minutos, fluxo de 1 mL/min, λ máximo de 278 nm e coluna de fase reversa C_{18} . A Figura 24 (pág. 73) exhibe o cromatograma resultante da injeção da mistura dos padrões a 1 mg/mL com as condições escolhidas para o estudo de validação do método.

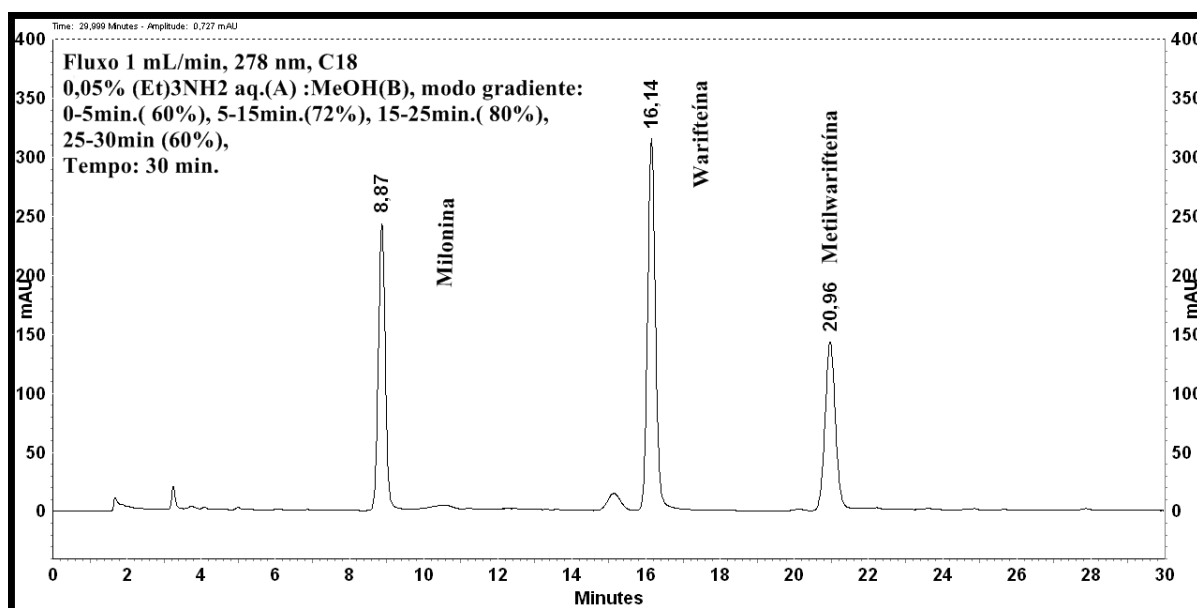
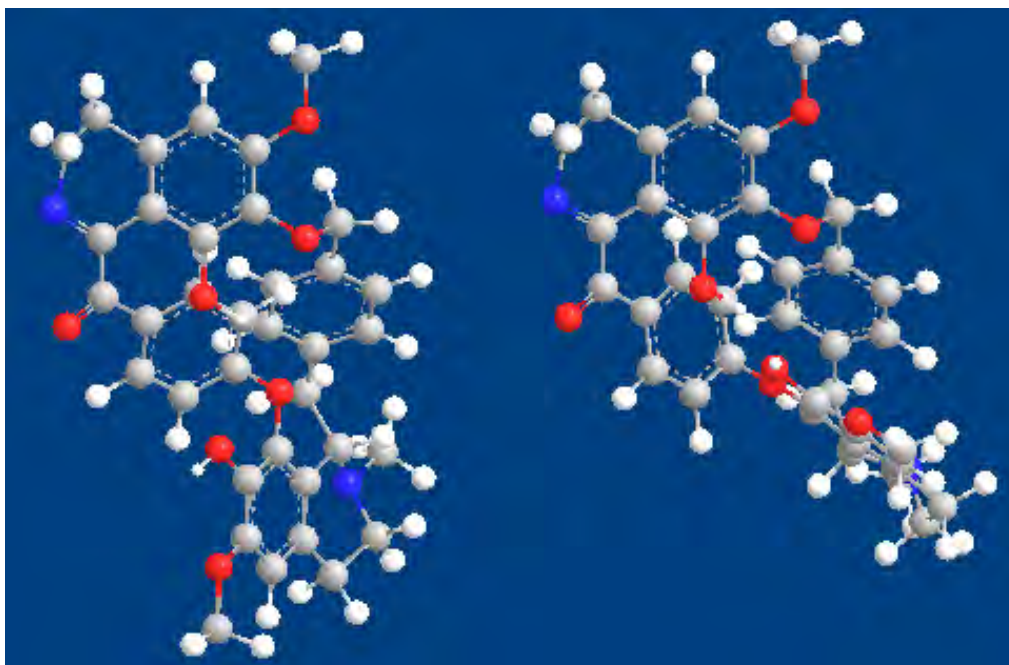


Figura 24: Cromatograma da mistura dos padrões a 100 µg/mL em modo gradiente: 0-5 min. (60%), 5-15 min. (72%), 15-25 min. (80%), 25-30 min. (60%). $\lambda = 278$ nm; coluna C₁₈.



Capítulo III

Validação do método

9. INTRODUÇÃO

9.1 Validação de Metodologias Analíticas para Medicamentos Fitoterápicos

Fitoterápico é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

Como produto final de uma série de sugestões apresentadas por diferentes segmentos da sociedade, foi estabelecido uma legislação para a área de fitoterápicos (Portaria 6/SVS de 31/01/1995), que definiu claramente que fitoterápico é um medicamento com componentes ativos exclusivamente de origem vegetal, e que deve apresentar comprovação de eficácia, segurança e qualidade. Também importante foi o estabelecimento no Ministério da Saúde, e posteriormente na Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, de uma divisão direcionada especificamente para fitoterápicos (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

A Resolução-RDC nº 48 de 16 de Março de 2004 dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e este regulamento abrange medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas vegetais. Não é objeto de registro ou cadastro planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2004). No entanto a RDC 48/2004 foi revogada pela RDC 14 de 31 de Março de 2010, com o objetivo de atualizar o regulamento para o registro de medicamentos fitoterápicos. As principais modificações foram relativas a conceitos e a adoção de alternativas ao controle de qualidade. O documento traz uma reforma da RDC 48 de 2004, com o enquadramento correto para cada exigência nas diferentes fases de análise de registro de um medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010).

É exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução (RDC nº 48), a elaboração de um relatório de controle de qualidade, incluindo análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie (LIMA *et al.*, 2006).

A validação é parte integrante da garantia da qualidade e se define como um ato documentado que atesta se qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduz aos resultados esperados. Portanto, a validação de procedimentos analíticos tem por objetivo demonstrar que os métodos de ensaio utilizados apresentam resultados que permitam avaliar objetivamente a qualidade dos medicamentos, conforme os parâmetros especificados (BRASIL, 2003).

Segundo a Resolução-RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise (RE 899, 2003).

Ainda de acordo com a RESOLUÇÃO nº 899/2003, ela define estes parâmetros analíticos da seguinte forma:

9.1.1 Especificidade e seletividade:

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A avaliação da seletividade do método é um importante modo para demonstrar a sua especificidade. Um método é dito específico se produz apenas uma resposta para um simples analito. Seletividade de um método é a capacidade do método de produzir respostas para um analito alvo distinguindo-o de todas as outras respostas uma vez que os métodos cromatográficos não produzem respostas apenas para um analito de interesse, mas também para outras substâncias de interesse, o termo seletividade é sempre mais apropriado neste contexto que especificidade (NASCIMENTO, 2004).

9.1.2 Linearidade:

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes.

Os dados podem ser tratados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas (LIMA, 2006).

O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$.

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida por meio dos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz, adição-padrão (MOREAU, 2008).

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentração conhecidas preparadas a partir de um padrão. Esse método é sensível a erros de preparo das amostras e dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras e por isso deve ser feito a cada análise (MOREAU, 2008).

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções-padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, as quais se adicionam a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Após análise dessas soluções, se constrói um gráfico, relacionado à razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração da substância. A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno (MOREAU, 2008).

O método de superposição de matriz consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar a da amostra, isenta da substância, e na construção do gráfico de calibração relacionado às áreas obtidas com as concentrações dos padrões. (MOREAU, 2008).

O método de adição-padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que esta sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionado às quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas.

O ponto em que a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem nenhuma adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas a concentração da substância na amostra analisada. O método da adição-padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando há dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (MOREAU, 2008). A Figura 25 exibe um exemplo da aplicação da adição-padrão na determinação da concentração de milonina, warifteína e metilwarifteína no extrato etanólico bruto das folhas de *Cissampelos sympodialis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

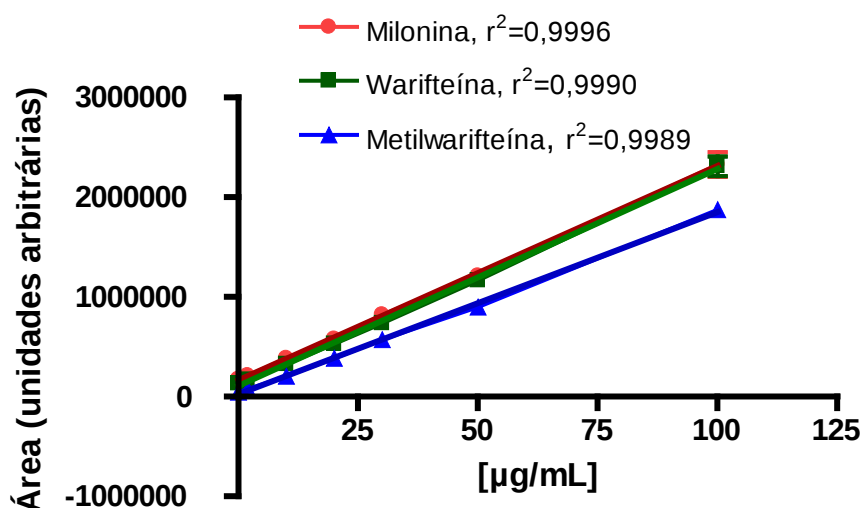


Figura 25: Exemplo da adição-padrão na determinação da concentração de milonina, warifteína e metilwarifteína em amostras de extrato etanólico bruto das folhas de *C. sympodialis*.

9.1.3 Intervalo:

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.

9.1.4 Precisão:

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta se divide em três níveis:

Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analito e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por no mínimo 9 determinações, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste.

Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Reprodutibilidade: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

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

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

em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. Não se admite valores superiores a 5%.

9.1.5 Limite de Detecção (LOD):

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

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

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

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

9.1.6 Limite de Quantificação (LOQ):

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas.

O Limite de Quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

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

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

Também pode ser determinado por meio do ruído, considerando a concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10 : 1.

9.1.7 Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança.

É determinado através de 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas cada, perfazendo um total de 9 determinações. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

De modo geral, quanto menor o número de etapas que constituem o método e quanto maiores a homogeneidade e uniformidade da composição do material analisado, menor será o erro inerente acumulado e, conseqüentemente o rigor será atingido. Durante a prática da validação é também importante observar a regularidade da produção. Os riscos de heterogeneidade são variáveis: número de fases, natureza dos produtos (características físicas, concentração e instabilidade), preparação e secagem, além do método de extração (ARAGÃO, 2002).

9.1.8 Robustes:

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método se diz robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

10. MATERIAIS E MÉTODO

10.1 Reagentes e materiais

- Metanol grau HPLC, MERCK;
- Álcool etílico 95% P.A-ACS (Quimex);
- Trietilamina, (MERCK);
- Água purificada (Elga Purelab Option-Q);
- Filtros para seringa com 0,45 µm de diâmetro de poro;
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência constituído de bomba LC-10 Advp, detector SPD-10AVvp, autoinjeter SIL-10Advp, forno CTO-10ASvp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14A, todos os módulos da SHIMADZU;
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência constituído de uma bomba LC-10 Advp, detector SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14A, todos da Shimadzu;

10.2 Seletividade

Para a avaliação da seletividade foi preparado uma solução com a mistura dos padrões a 100 µg/mL e injetado no CLAE/DAD para verificar a separação cromatográfica da milonina, warifteína e metilwarifteína. Depois foram analisados os espectros de UV característicos de cada marcador através de comparações. Foi preparada uma amostra do extrato etanólico bruto sem adição dos marcadores e injetado para obter seus tempos de retenção, comparando-os com os dos padrões. Outra amostra do extrato adicionada de 100 µg/mL dos padrões foi injetada e os tempos de retenção foram então comparados para a confirmação de cada marcador na amostra.

Índice de similaridade

O índice de similaridade foi usado para comparar a pureza dos picos cromatográficos da milonina, warifteína e metilwarifteína na amostra do extrato sem adição dos padrões em relação a dos padrões em solução e avaliar se há presença de interferentes coeluintes com os marcadores. Valores acima de 0,90 determinam a pureza espectral dos picos cromatográficos. A pureza do pico foi calculada através de

comparações de 3 pontos no pico cromatográfico. O ponto 1 no início do pico cromatográfico, o ponto 2 no ápice do pico e o ponto 3 no final do pico.

10.3 Linearidade

A alíquotas de 250 µL de uma solução a 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das folhas, foram adicionadas soluções estoques a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína para obter as seguintes concentrações nominais:

- Amostra sem adição dos padrões (zero µg/mL): 250 µL do extrato + 750 µL da fase móvel;
- Para a concentração de 2,0 µg/mL: foi realizado uma diluição das soluções estoques até obter soluções de concentração de 40 µg/mL. Destas soluções foi pipetado 50 µL de cada marcador: 250 µL do extrato + 50 µL de milonina + 50 µL de warifteína + 50 µL de metilwarifteína + 600 µL da fase móvel;
- 10 µg/mL: 250 µL do extrato + 10 µL de milonina + 10 µL de warifteína + 10 µL de metilwarifteína + 720 µL de fase móvel;
- 20 µg/mL: 250 µL do extrato + 20 µL de milonina + 20 µL de warifteína + 20 µL de metilwarifteína + 690 µL de fase móvel;
- 30 µg/mL: 250 µL do extrato + 30 µL de milonina + 30 µL de warifteína + 30 µL de metilwarifteína + 660 µL de fase móvel;
- 50 µg/mL: 250 µL do extrato + 50 µL de milonina + 50 µL de warifteína + 50 µL de metilwarifteína + 600 µL de fase móvel;
- 100 µg/mL: 250 µL do extrato + 100 µL de milonina + 100 µL de warifteína + 100 µL de metilwarifteína + 450 µL de fase móvel.

As amostras foram injetadas no cromatógrafo (20 µL) em triplicatas através do injetor automático, e as áreas dos picos cromatográficos foram utilizadas para a construção das curvas de calibração e avaliação de linearidade.

Juntamente com as curvas de calibração obtidas na linearidade, gráficos de resíduos foram feitos para demonstrar se os valores estavam livres de desvios e se existia tendência.

Também foi verificado o perfil cromatográfico dos extratos pela injeção em CLAE com as seguintes condições cromatográficas: fluxo 1mL/min.; modo gradiente: 5-95% em H₂O (0,05% TEA) (A): MeOH (B); tempo: 65 min; λ = 278 nm. Pelo fato de todos os estudos farmacológicos com o extrato serem feitos com a fração aquosa, esta

foi preparada e injetada para verificar se na fração aquosa do extrato estudado tem os marcadores. Para isso, foi pesado 300 mg do extrato e adicionado 300 μ L de água purificada em eppendorf. Depois foi extraído no Vórtex por 5 min. e no Ultrassom por 20 min. Transferiu-se o eppendorf para a centrífuga com as seguintes condições: 12.000 rpm, tempo de 10 min. a temperatura de 4°C. O sobrenadante resultante do processo de extração foi então filtrado e injetado.

10.4 Precisão e exatidão

Para análise da precisão e exatidão foram escolhidas três concentrações: Baixa (2 μ g/mL), Média (50 μ g/mL) e Alta (80 μ g/mL). Essas amostras foram preparadas em quintuplicatas juntamente com as curvas de calibração por adição de cada marcador químico (descrito no item 10.3 da Linearidade) e injetado em CLAE/UV e Vis. As análises foram realizadas em três dias diferentes. Para a preparação das amostras de precisão e exatidão seguiu-se o seguinte procedimento:

A alíquotas de 250 μ L de uma solução a 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das folhas, foram adicionadas soluções a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína e completadas com fase móvel para obter as seguintes concentrações nominais:

- Concentração Baixa de 2 μ g/mL: da mesma forma que descrito no item 10.3 da Linearidade;
- Concentração Média de 50 μ g/mL: da mesma forma que descrito no item 10.3 da Linearidade;
- Concentração Alta de 80 μ g/mL: 250 μ L do extrato + 80 μ L de milonina + 80 μ L de warifteína + 80 μ L de metilwarifteína + 510 μ L de fase móvel.

Para o cálculo do valor teórico de cada concentração no extrato, foi somada a quantidade de milonina, warifteína e metilwarifteína adicionado ao extrato com suas quantidades pré-existentes na amostra do extrato, e com a equação da reta obtida com as curvas de calibração igualando y a zero.

Para calcular os valores verdadeiros de milonina, warifteína e metilwarifteína no extrato foi substituída a incógnita y da equação da reta pelos valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos para as concentrações Baixa, Média e Alta e estes resultados foram somados com a quantidade de milonina, warifteína e metilwarifteína pré-existentes no extrato.

Através destes valores foi calculada a precisão, com o desvio padrão relativo, e a exatidão dividindo a concentração média experimental pela concentração teórica e multiplicando por 100.

10.5 Robustez

Foram preparadas três amostras cujas concentrações foram: 2, 50 e 100 µg/mL (da mesma forma que o descrito no item 10.3 da Linearidade) e depois realizadas três injeções de cada amostra com a metodologia validada (ver o item desenvolvimento cromatográfico). O primeiro parâmetro a ser verificado foi à temperatura do forno que mudou de 40°C para 38°C e 42°C. O segundo parâmetro a ser verificado foi à mudança da coluna cromatográfica que passou de uma coluna de C-18 para uma coluna C-8. E o último parâmetro a ser analisado foi a concentração de trietilamina (TEA) que passou de 0,05% na solução aquosa para 0,1%. Para calcular o coeficiente de variação (CV%) dividiu-se a média da área da amostra (Aa) pela média da área do padrão (Ap), depois se multiplicou por 100 e por fim se subtraiu de 100:

$$CV\% = (Aa/Ap \times 100) - 100$$

10.6 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para calcular os limites de detecção e de quantificação da milonina, warifteína e metilwarifteína foram feitas as suas estimativas baseadas nas curvas de calibração obtidas no estudo da Linearidade seguindo a RE 899/2003. A estimativa para o cálculo do limite de detecção foi feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base através da seguinte equação:

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

onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração (Slope).

Já a estimativa para o cálculo do limite de quantificação foi feita com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base através da seguinte equação:

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

10.7 Estudo de estabilidade a temperatura ambiente

Foram preparadas duas amostras cujas concentrações foram de 4 µg/mL e 80 µg/mL. e em seguida realizadas três injeções de cada amostra com a metodologia validada no CLAE. A amostra de 80 µg/mL foi preparada da mesma forma que esta descrito no item da Precisão e Exatidão (pág. 83). Já o procedimento para a preparação da amostra de 4 µg/mL foi: 250 µL do extrato + 4 µL de milonina + 4 µL de warifteína + 4 µL de metilwarifteína + 738 µL de fase móvel. Após terminar a corrida cromatográfica as amostras foram colocadas no balcão e deixadas à temperatura ambiente por 8 horas seguidas. Depois desse tempo elas foram novamente analisadas no CLAE e suas médias foram comparadas com os resultados anteriores através dos coeficientes de variação (CV%) e perfil cromatográfico.

10.8 Degradação ácida

Em 250 µL do extrato (25 mg/mL) foi adicionado 500 µL de warifteína a 1 mg/mL, 500 µL de metilwarifteína a 1mg/mL e 500 µL de milonina a 1mg/mL mais 250 µL de HCl 0,4 M e 3 mL de solução tampão fosfato pH=7,0. Esta solução foi colocada em um tubo de ensaio e levada ao aparelho Dry Block a uma temperatura de 80°C durante 15 min. Depois foram injetadas em CLAE amostras antes do processo de stress ácido (recém-preparadas) e amostras após o processo de stress ácido.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1 Seletividade

A Figura 26 mostra o cromatograma da injeção de 100 µg/mL da mistura dos marcadores químicos obtido em CLAE/DAD. A Figura também mostra o espectro de ultravioleta (UV) da milonina, warifteína e metilwarifteína.

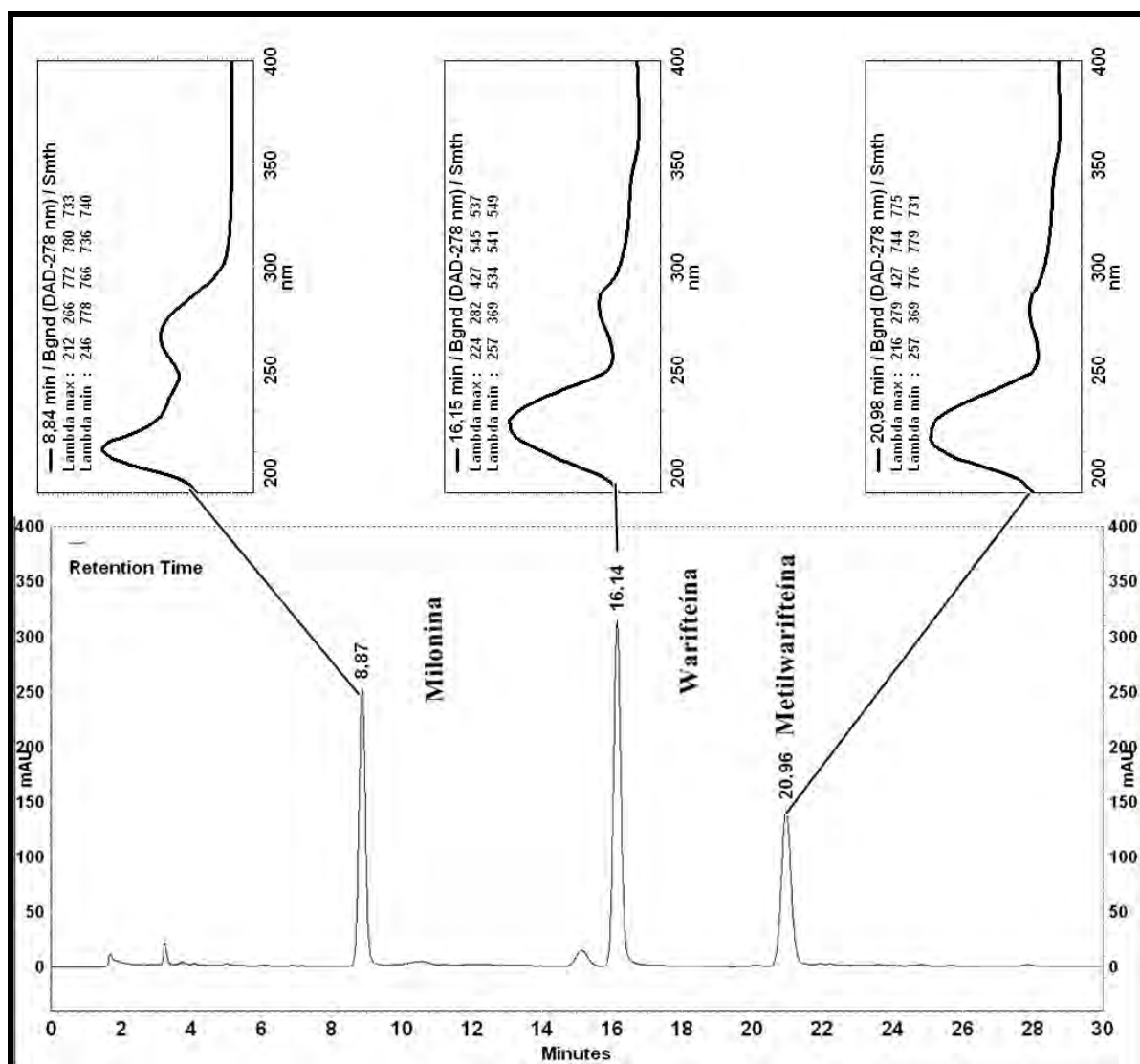


Figura 26: Cromatograma da injeção de 100 µg/mL da mistura dos padrões mostrando o espectro de ultravioleta da milonina, warifteína e metilwarifteína.

A Figura 27 (pág. 87) exibe o cromatograma obtido com a injeção do extrato etanólico bruto diluído e filtrado sem adição de milonina, warifteína e metilwarifteína, enquanto a Figura 28 (pág. 87) mostra o mesmo extrato adicionado de 100 µg/mL dos marcadores químicos.

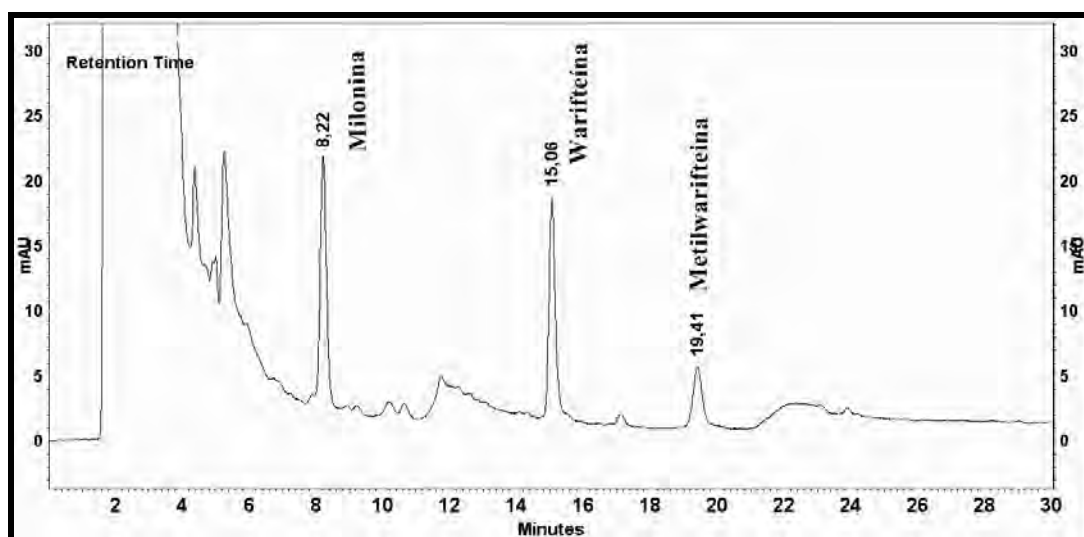


Figura 27: Cromatograma da injeção do extrato sem adição dos padrões em CLAE/DAD na seletividade do método.

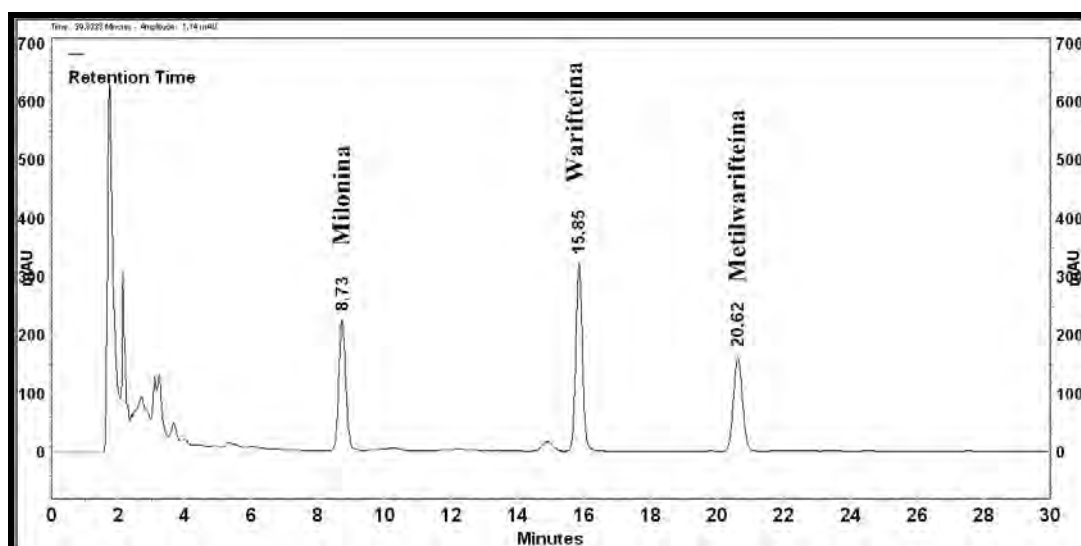


Figura 28: Cromatograma da injeção do extrato com adição de 100 µg/mL dos padrões em CLAE/DAD. na seletividade do método.

A Figura 29 (pág. 88) mostra que a milonina (A) apresentou um índice de similaridade que variou entre 0,98 na base do pico cromatográfico a 0,99 no ápice do pico cromatográfico sem a presença de interferentes. A pureza de pico na análise dos três pontos foi de 99,1%. A warifteína (B) apresentou um índice de similaridade que variou de 0,981 na base do pico a 0,986 no seu ápice. A pureza de pico na análise dos três pontos foi de 98,4%. Já o índice de similaridade da metilwarifteína (C) variou entre 0,978 na base do pico a 0,973 no seu ápice. A pureza de pico registrada foi de 97,5%. O método demonstrou especificidade/seletividade para os três picos estudados.

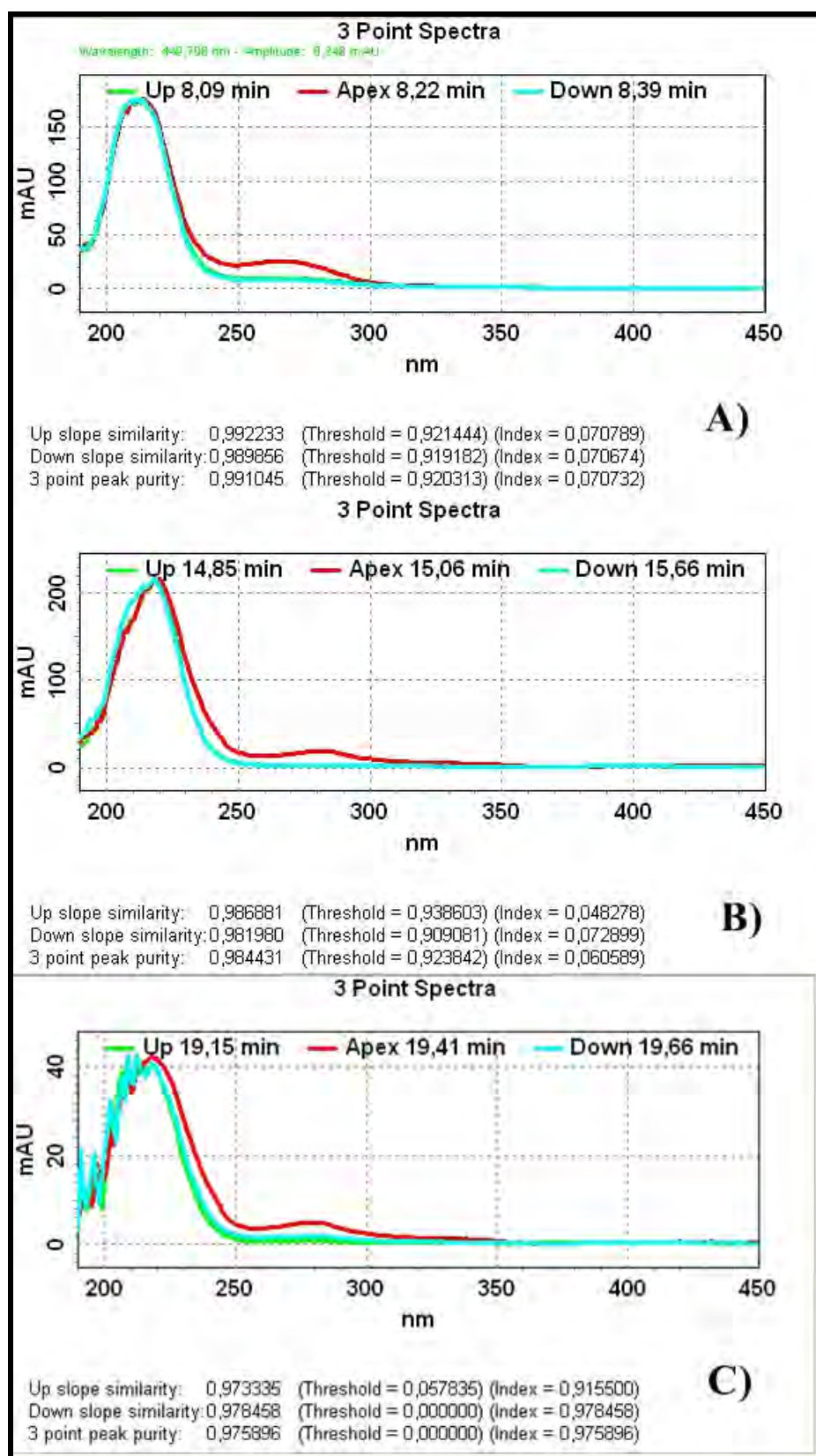


Figura 29: Perfil de pureza da milonina (A), warifteína (B) e metilwarifteína (C) no extrato sem adição dos marcadores obtidos em CLAE/DAD na seletividade.

11.2 Linearidade

A Tabela 2 mostra as médias das áreas dos picos cromatográficos em relação às suas concentrações crescentes na avaliação do primeiro dia da Linearidade para os alcalóides milonina, warifteína e metilwarifteína adicionados ao extrato etanólico bruto, e que por regressão linear resultou em um coeficiente de correlação linear de $r^2=0,9996$ para a milonina, $r^2= 0,9990$ para a warifteína e $r^2=0,9989$ para a metilwarifteína. Na estatística do teste o intervalo de 95% de confiança para a milonina ficou entre 6,439 a 8,866 µg/mL, para a warifteína entre 3,226 a 6,698 a µg/mL e para a metilwarifteína entre 0,2931 a 3,176 µg/mL. Fazendo-se a extrapolação para zero com a equação da reta ($y=0$), foram encontradas as concentrações originais da amostra para a milonina de 7,630 µg/mL, warifteína de 4,916 µg/mL e metilwarifteína de 1,395 µg/mL, portanto, todos dentro do intervalo de 95% de confiança.

Tabela 2: Resultados do primeiro dia de avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	175338	133212	44595
2	2	212552	169150	73853
3	10	383532	325186	203551
4	20	576973	529069	385285
5	30	820519	733960	571073
6	50	1212389	1165328	898004
7	100	2329233	2310329	1874664
Inclinação		21520 ± 202.7	21780 ± 305.7	18270 ± 270.4
Intercepto de Y quando X=0		164200 ± 9036	107100 ± 13630	25490 ± 12050
Intercepto de X quando Y=0		-7,630	-4,916	-1,395
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		20990 to 22040	20990 to 22560	17570 to 18960
Intercepto de X quando Y=0.0		-8,866 to -6,439	-6,698 to -3,226	-3,176 to 0,2931
r^2		0,9996	0,9990	0,9989
F		11260	5074	4564
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções das amostras feitas em triplicatas.

A Figura 30 mostra as três curvas de calibração obtidas para os marcadores milonina, warifteína e metilwarifteína. Estes resultados demonstram claramente a relação linear entre as concentrações dos marcadores nas soluções testes com a resposta do detector (UV-Vis) expressados em áreas de picos. A Figura 31 mostra a distribuição aleatória dos resíduos, com valores positivos e negativos em relação ao eixo zero para os três marcadores, portanto, livre de tendências.

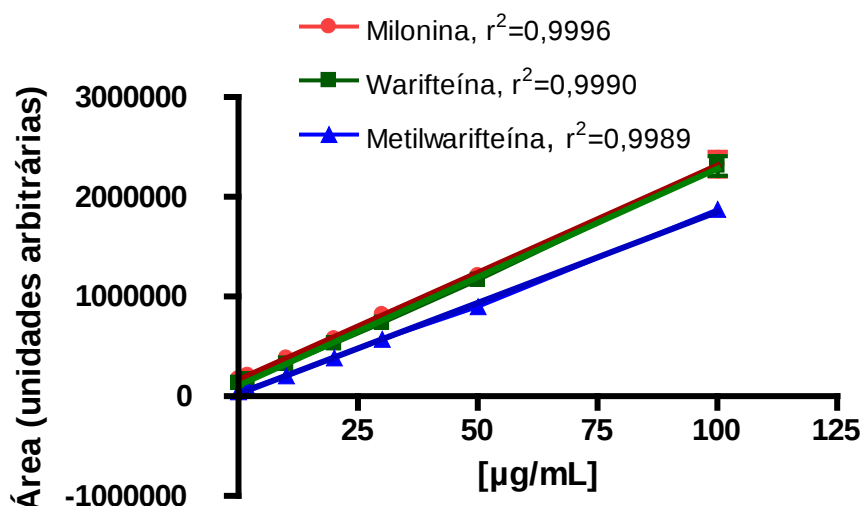


Figura 30: Curvas de calibração obtidas no primeiro dia de avaliação da linearidade.

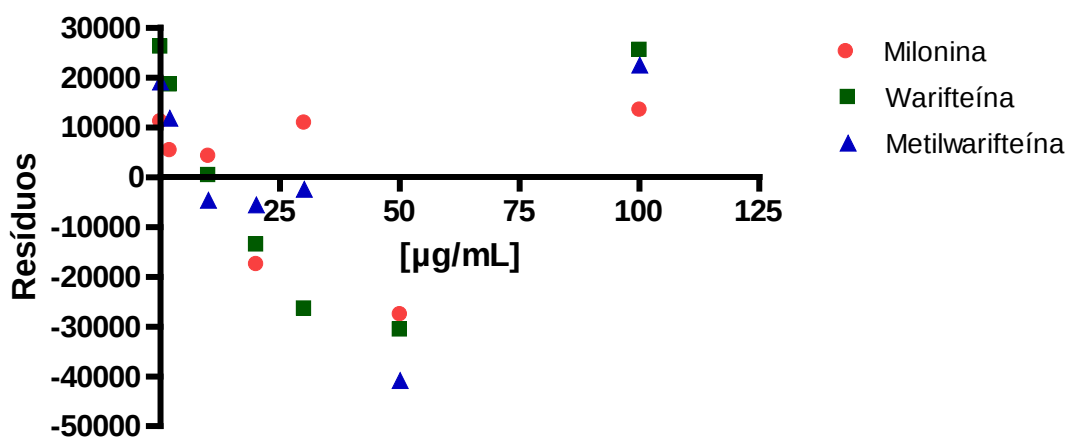


Figura 31: Gráfico de resíduos das primeiras curvas de calibração.

As Figuras 32, 33, 34 e 35 mostram alguns dos cromatogramas obtidos no primeiro dia do estudo da Linearidade do método.

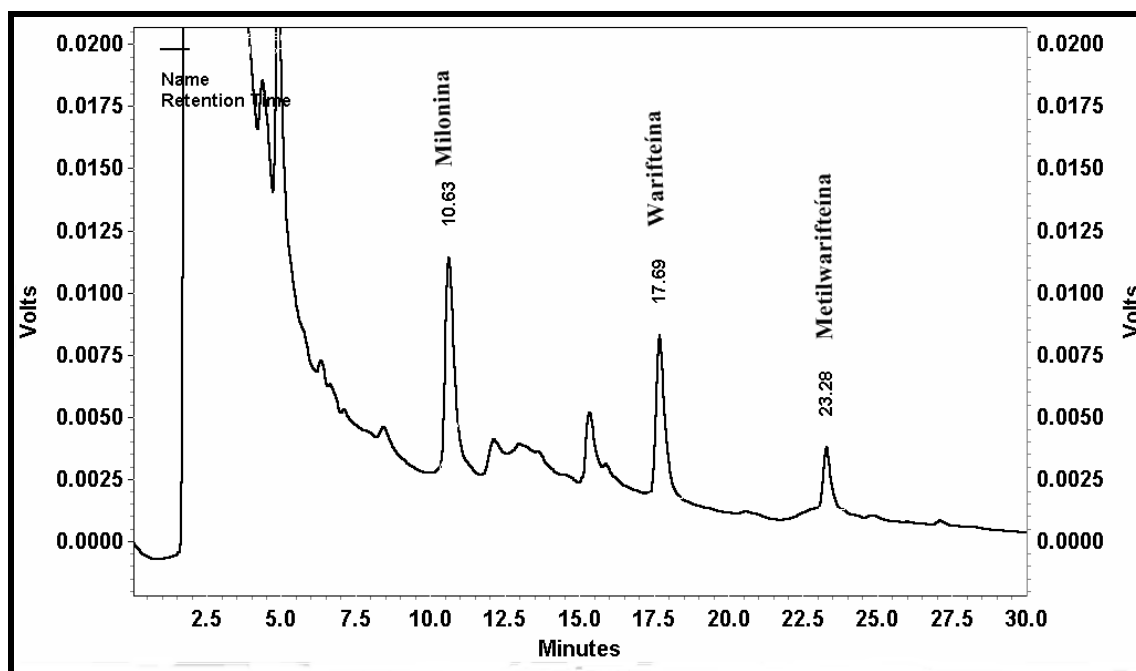


Figura 32: Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no primeiro dia da Linearidade.

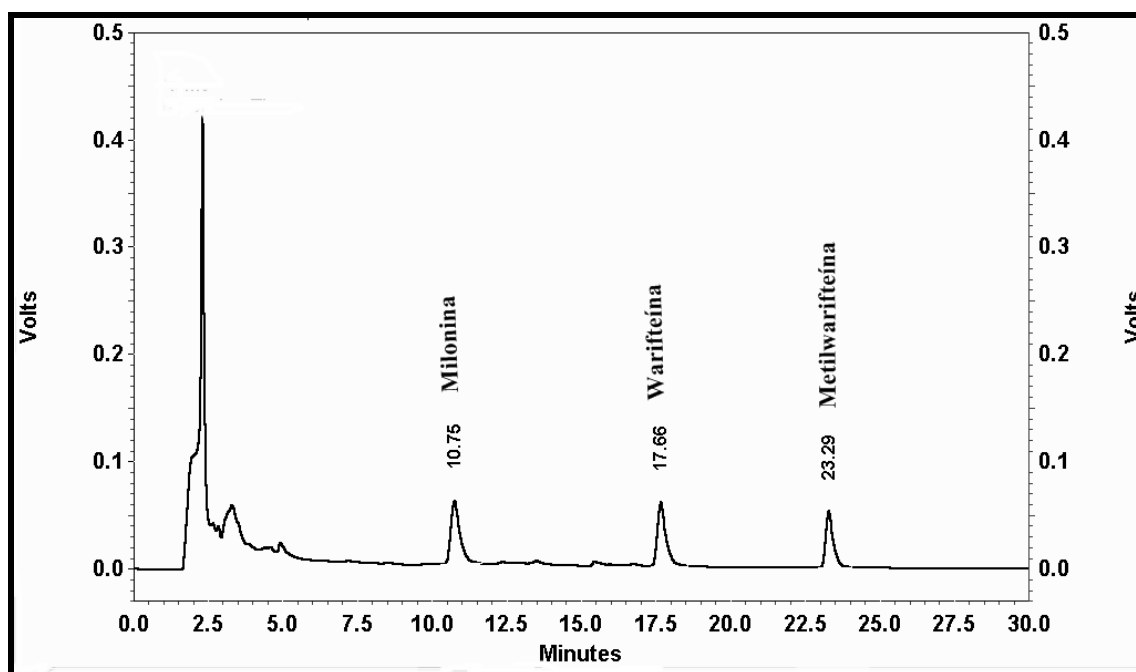


Figura 33: Cromatograma do extrato adicionado de 50 µg/mL de marcadores no primeiro dia da Linearidade.

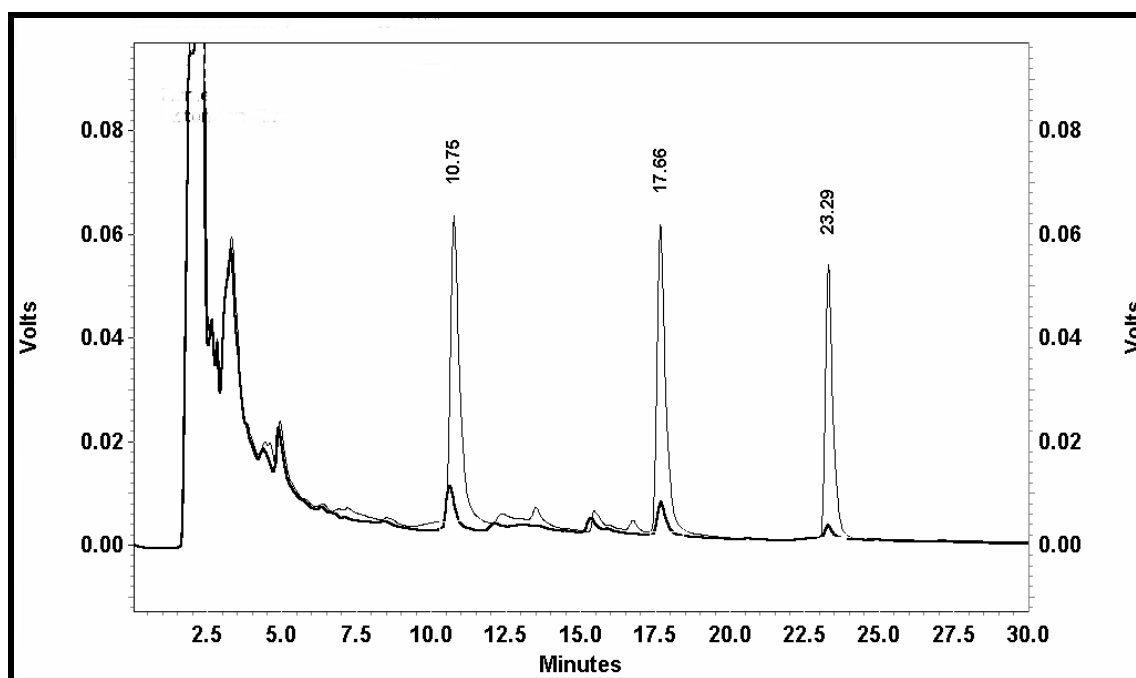


Figura 34: Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50 µg/mL (linha clara) sobrepostos no primeiro dia da Linearidade.

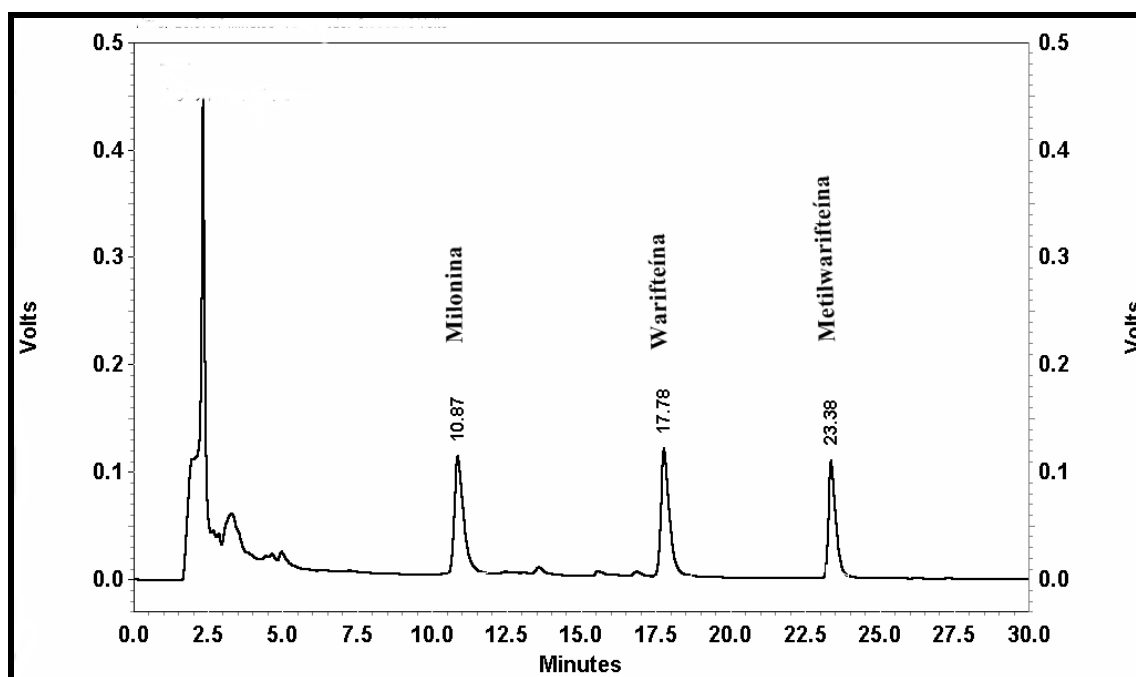


Figura 35: Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no primeiro dia da Linearidade.

A Tabela 3 exibe os resultados obtidos com o segundo dia de análise para o estudo de Linearidade. Os coeficientes de correlação linear obtidos para milonina, warifteína e metilwarifteína foram de $r^2 = 0,9995$, $r^2 = 0,9979$ e $r^2 = 0,9995$, respectivamente. As concentrações originais foram de 7,811 µg/mL para milonina, 5,604 µg/mL para warifteína e 1,551 µg/mL para metilwarifteína. O intervalo de 95% de confiança para a milonina ficou entre 6,495 a 9,181 µg/mL, de 3,154 a 8,250 µg/mL para a warifteína e de 0,387 a 2,758 µg/mL para a metilwarifteína, portanto, todas as concentrações obtidas com as curvas de calibração dos marcadores ficaram dentro do intervalo de confiança.

Tabela 3: Resultados da segunda avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	179287	133698	44315
2	2	210503	156990	67939
3	10	345327	299084	190084
4	20	560211	519079	374687
5	30	787218	713822	522796
6	50	1163180	1036863	874394
7	100	2221388	2124849	1758266
Inclinação		20500 ± 213.2	19840 ± 404.1	17200 ± 173.7
Intercepto de Y quando X=0		160100 ± 9500	111200 ± 18010	26680 ± 7740
Intercepto de X quando Y=0		-7,811	-5,604	-1,551
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		19950 to 21050	18800 to 20880	16750 to 17640
Intercepto de X quando Y=0.0		-9,181 to -6,495	-8,250 to -3,154	-2,758 to -0,387
r^2		0,9995	0,9979	0,9995
F		9250	2410	9806
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções das amostras feitas em triplicatas.

A Figura 36 mostra as três curvas de calibração obtidas no segundo dia de análise do estudo de Linearidade. Os coeficientes de correlação linear estão todos dentro do especificado pela RE899 que é de $r^2=0,99$. A Figura 37 é o gráfico de resíduos e mostra valores positivos e negativos para todos os marcadores, portanto, livre de tendências.

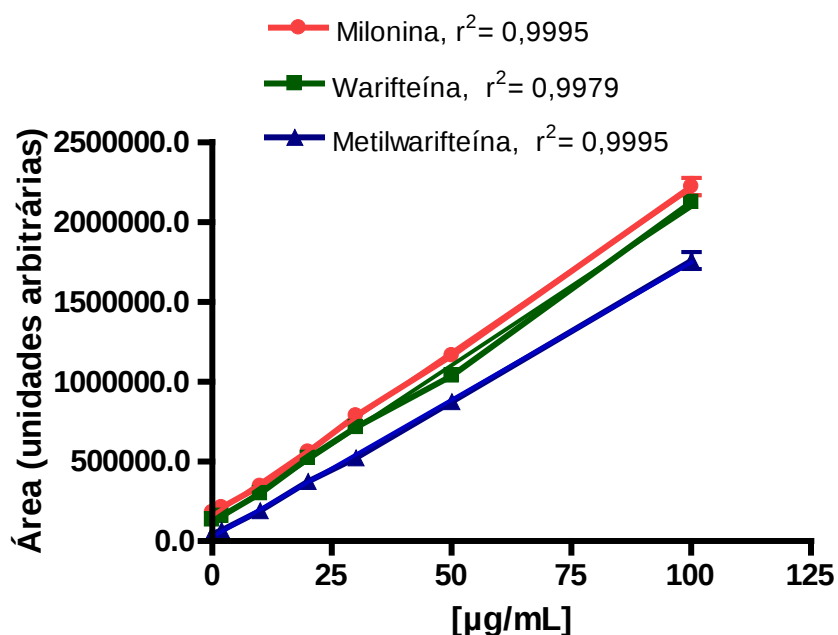


Figura 36: Curvas de calibração obtidas no segundo dia de avaliação da linearidade.

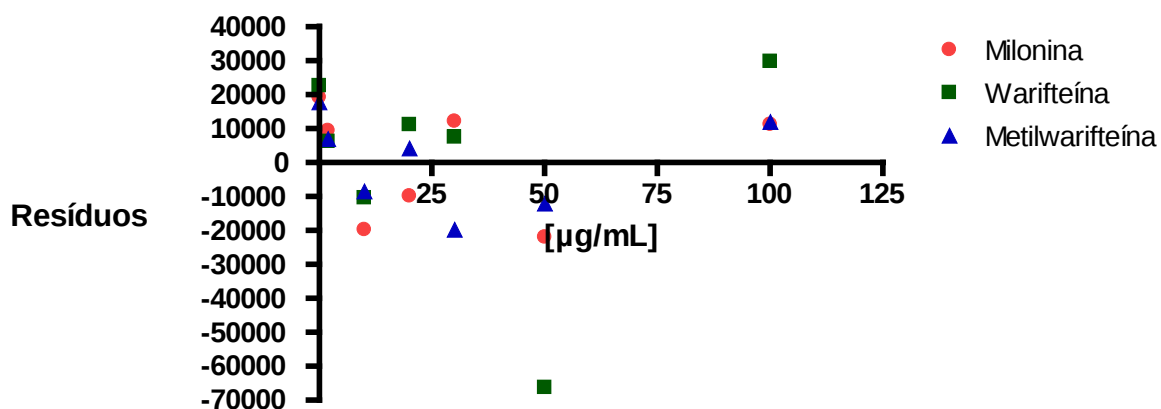


Figura 37: Gráfico de resíduos das segundas curvas de calibração.

As Figuras 38, 39, 40 e 41 mostram alguns dos cromatogramas obtidos no segundo dia do estudo da Linearidade do método.

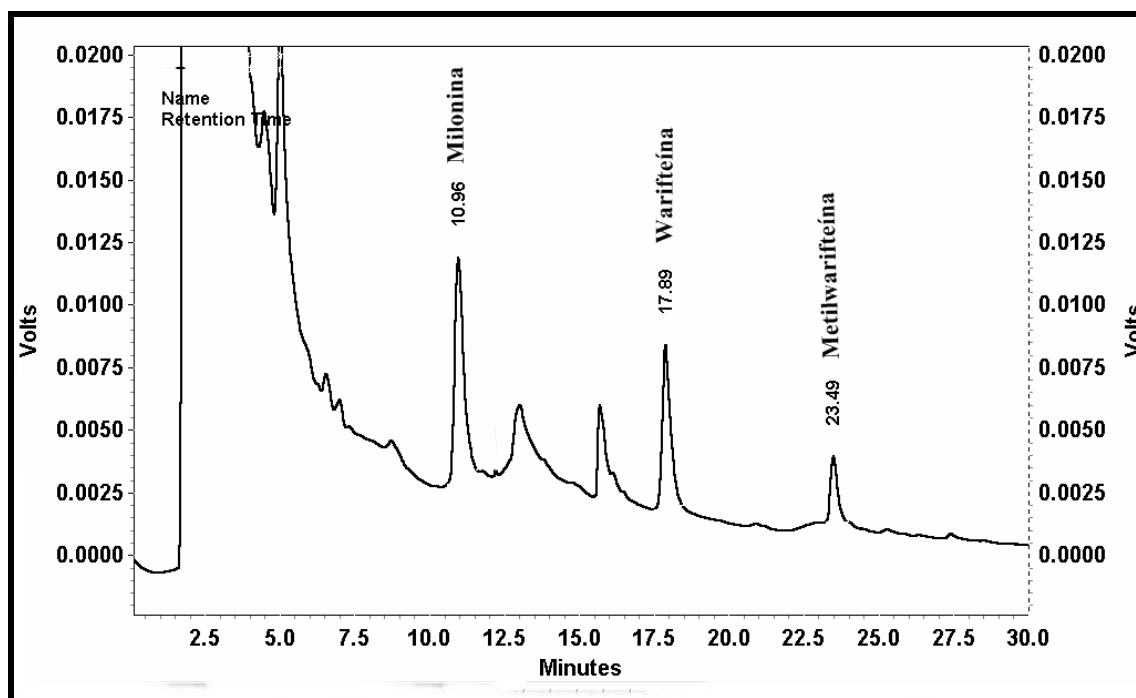


Figura 38: Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no segundo dia da Linearidade.

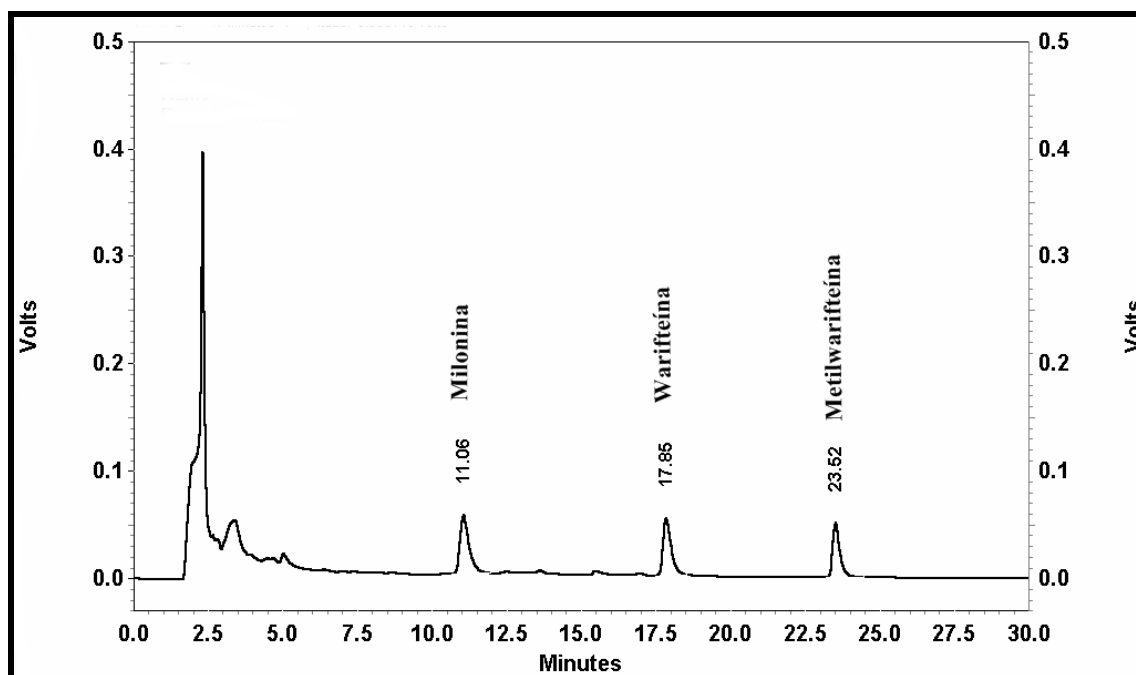


Figura 39: Cromatograma do extrato adicionado de 50 µg/mL de marcadores no segundo dia da Linearidade.

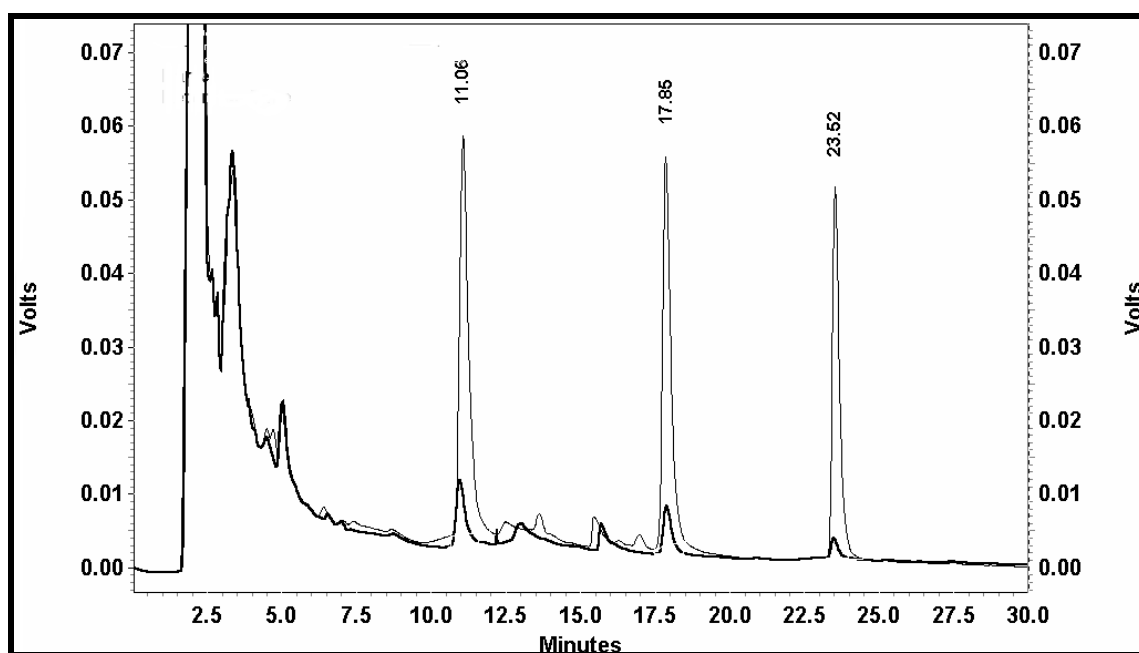


Figura 40: Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50 µg/mL (linha clara) sobrepostos no segundo dia da Linearidade.

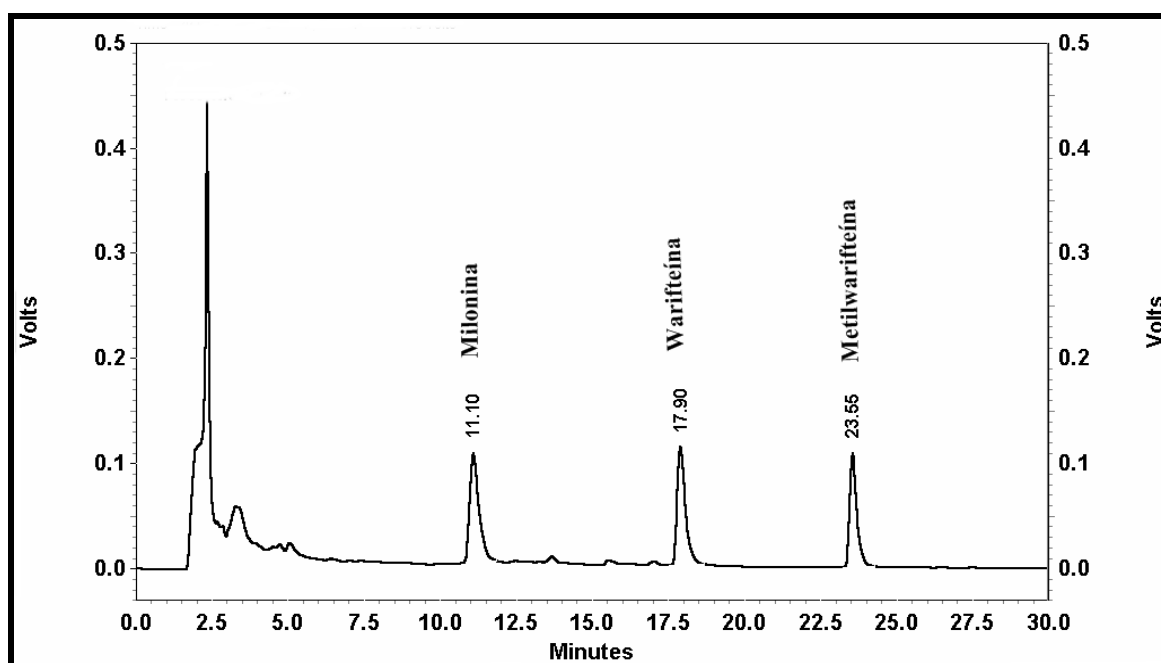


Figura 41: Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no segundo dia da Linearidade.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para o terceiro dia de avaliação da Linearidade. O coeficiente de correlação linear para a milonina foi de $r^2 = 0,9989$, para a warifteína de $r^2 = 0,9990$ e para a metilwarifteína de $r^2 = 0,9997$. As concentrações originais dos alcalóides foram: 8,75 µg/mL (milonina), 5,38 µg/mL (warifteína) e 2,036 µg/mL (metilwarifteína). Todos estes resultados estão dentro do intervalo de 95% de confiança, cujos valores foram: 6,82 a 10,80 µg/mL (milonina), 3,69 a 7,16 µg/mL (warifteína) e 1,12 a 2,69 µg/mL (metilwarifteína).

Tabela 4: Resultados da terceira avaliação da relação linear entre as áreas dos picos de milonina, warifteína e metilwarifteína e suas concentrações.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	186012	135028	46746
2	2	239711	169976	77728
3	10	387085	316901	201212
4	20	610366	520722	400716
5	30	823360	726079	588738
6	50	1177255	1116227	970613
7	100	2299363	2223378	1868349
Inclinação		20940 ± 317.0	20860 ± 290.8	18360 ± 142.9
Intercepto de Y quando X=0		183300 ± 14130	112200 ± 12960	37380 ± 6370
Intercepto de X quando Y=0		-8,753	-5,380	-2,036
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		20130 to 21760	20110 to 21610	17990 to 18730
Intercepto de X quando Y=0.0		-10.80 to -6.828	-7.161 to -3.690	-2.969 to -1.129
r^2		0,9989	0,9990	0,9997
F		4366	5146	16500
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções das amostras feitas em triplicatas.

A Figura 42 (pág. 98) mostra as três curvas de calibração obtidas no terceiro dia de análise do estudo de Linearidade. As relações entre as concentrações das amostras e as áreas dos picos cromatográficos foram lineares como esta demonstrado na Figura 42, e livres de tendências, como é visualizado na Figura 43 (pág. 98), gráfico dos resíduos, com valores positivos e negativos para os três marcadores.

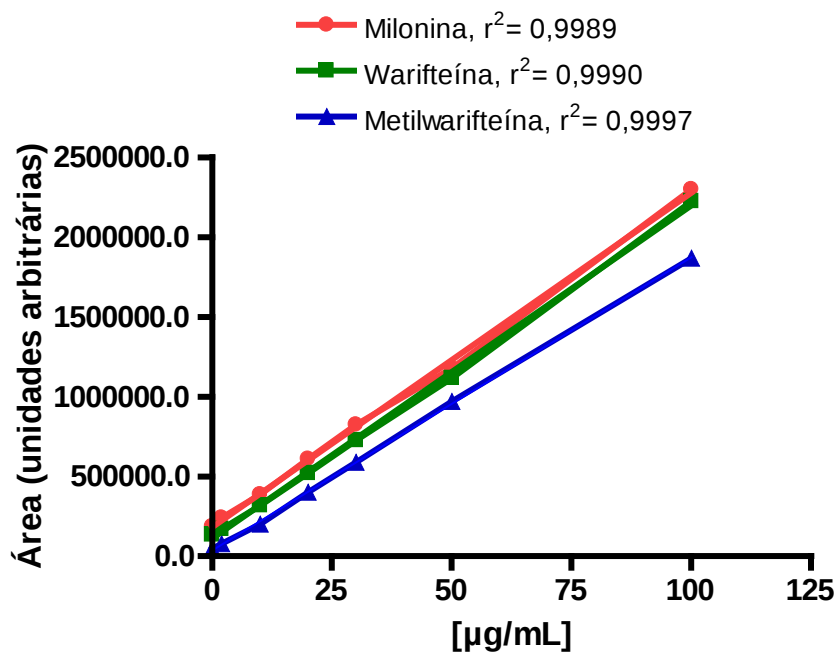


Figura 42: Curvas de calibração obtidas no terceiro dia de avaliação da Linearidade.

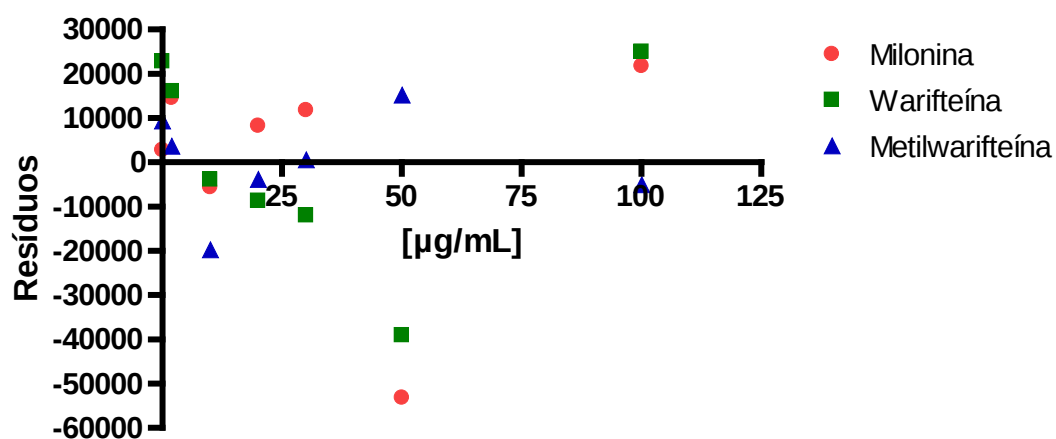


Figura 43: Gráfico dos resíduos das terceiras curvas de calibração.

As Figuras 44, 45, 46 e 47 mostram alguns dos cromatogramas obtidos no terceiro dia do estudo da Linearidade do método e a Figura 48 (pág. 101) mostra os cromatogramas obtidos na verificação do perfil cromatográfico do extrato.

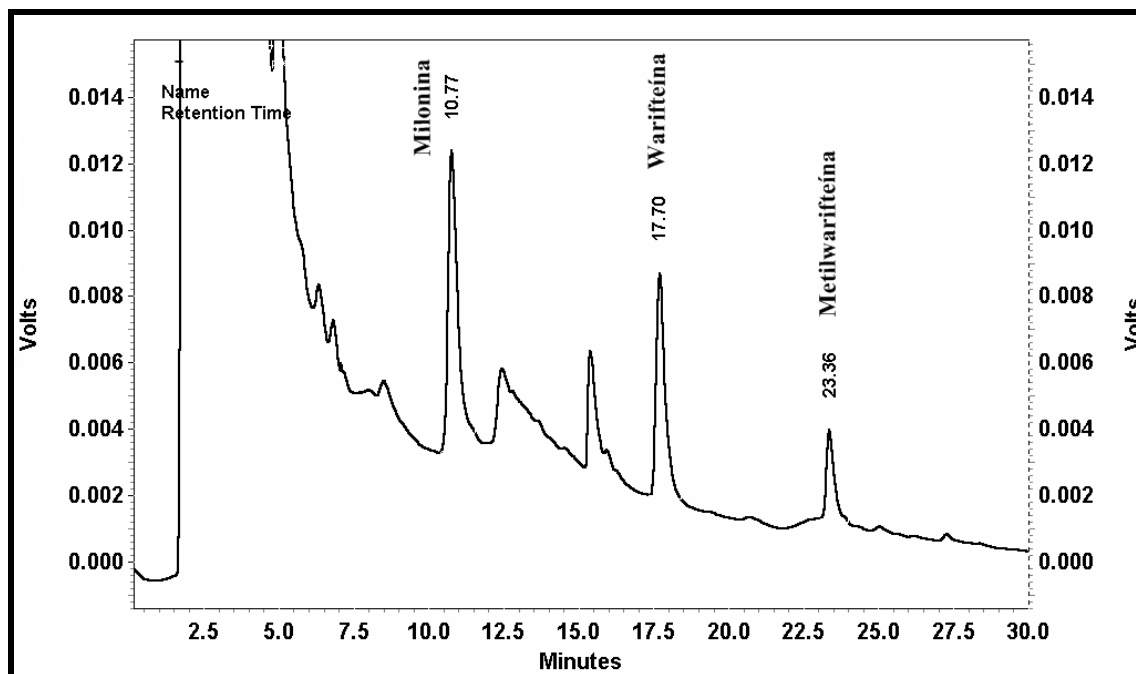


Figura 44: Cromatograma do extrato não adicionado de marcadores no terceiro dia da Linearidade.

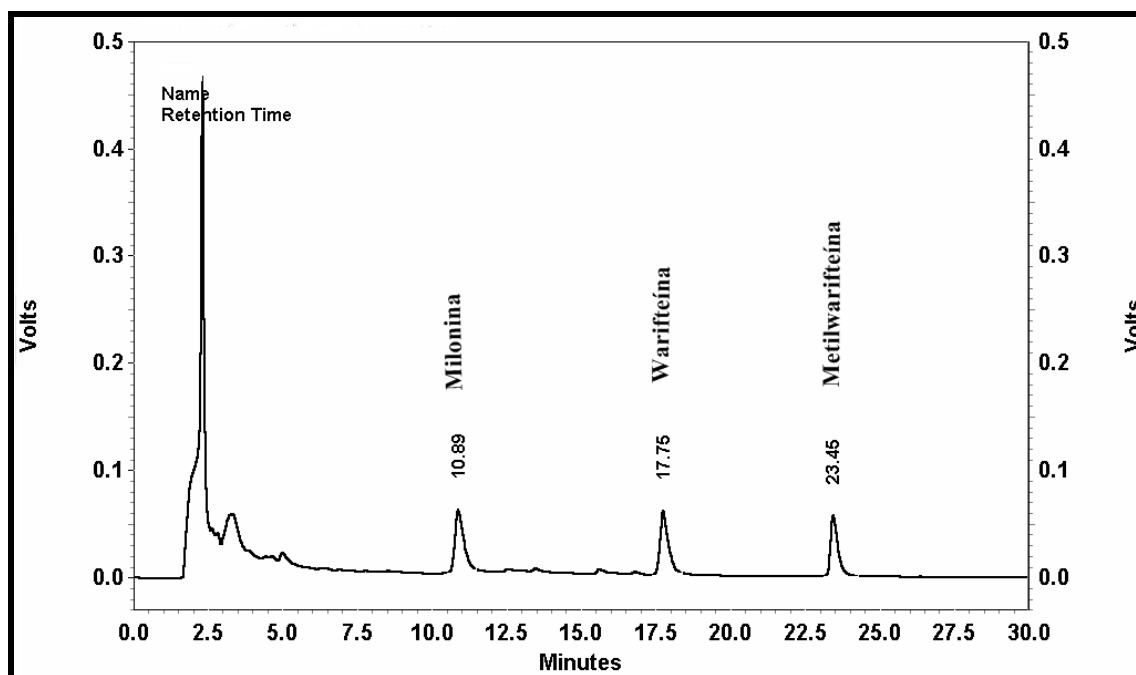


Figura 45: Cromatograma do extrato adicionado de 50µg/mL de marcadores no terceiro dia da Linearidade.

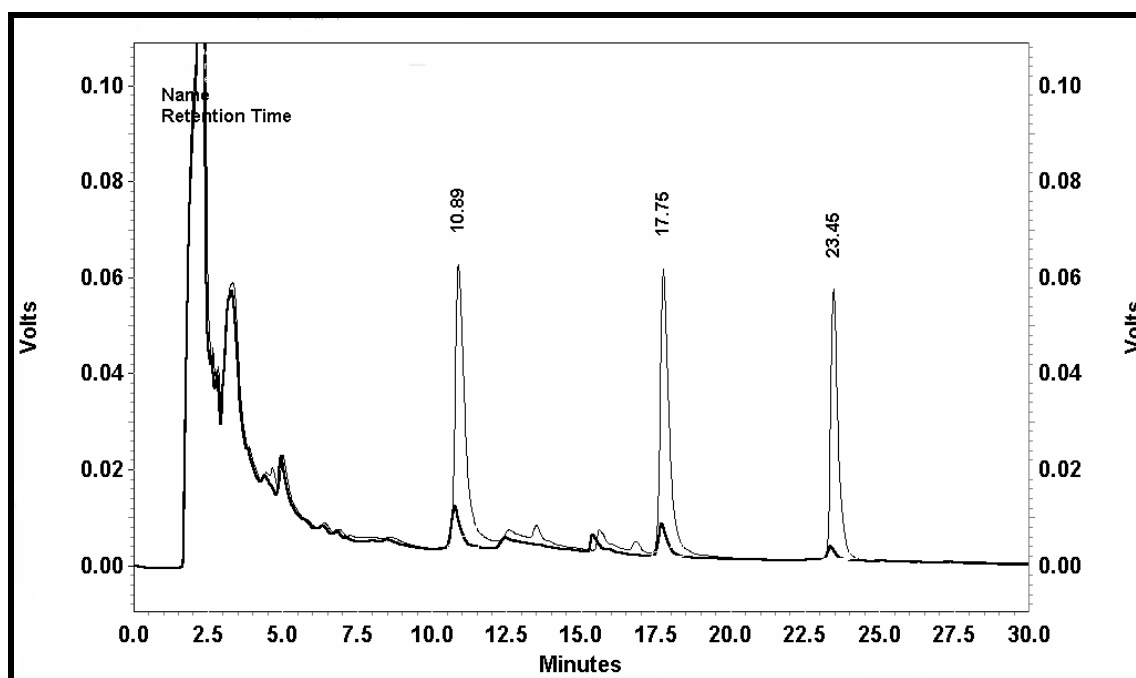


Figura 46: Cromatogramas do extrato sem adição (linha escura) e do extrato adicionado de 50 µg/mL (linha clara) sobrepostos no terceiro dia da Linearidade.

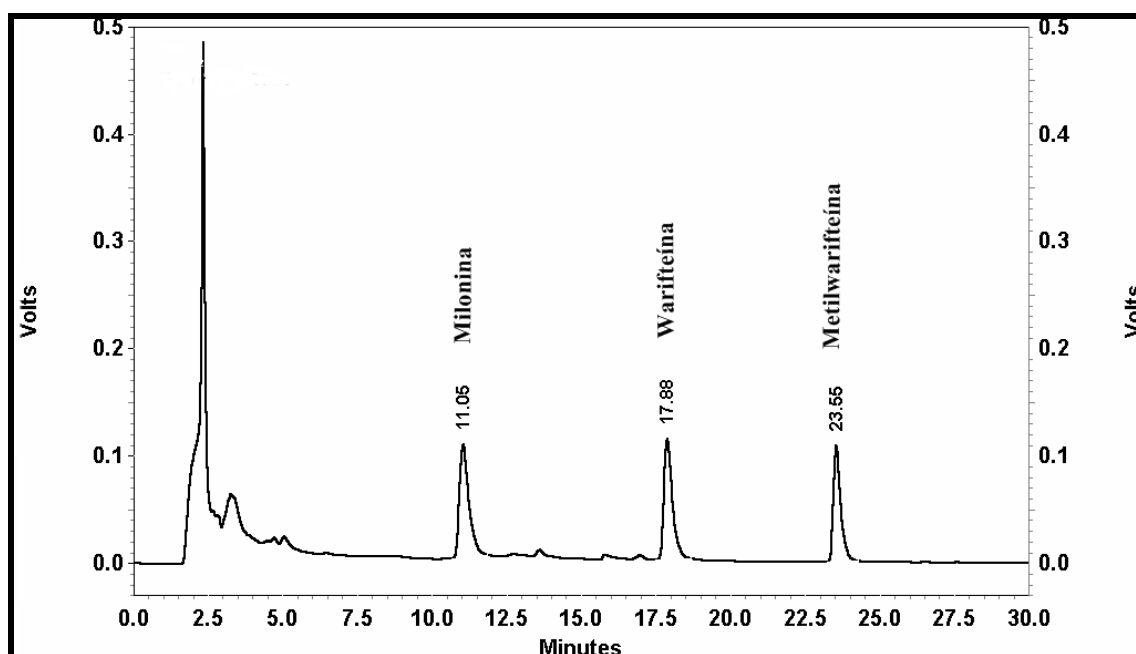


Figura 47: Cromatograma do extrato adicionado de 100 µg/mL de marcadores no terceiro dia da Linearidade.

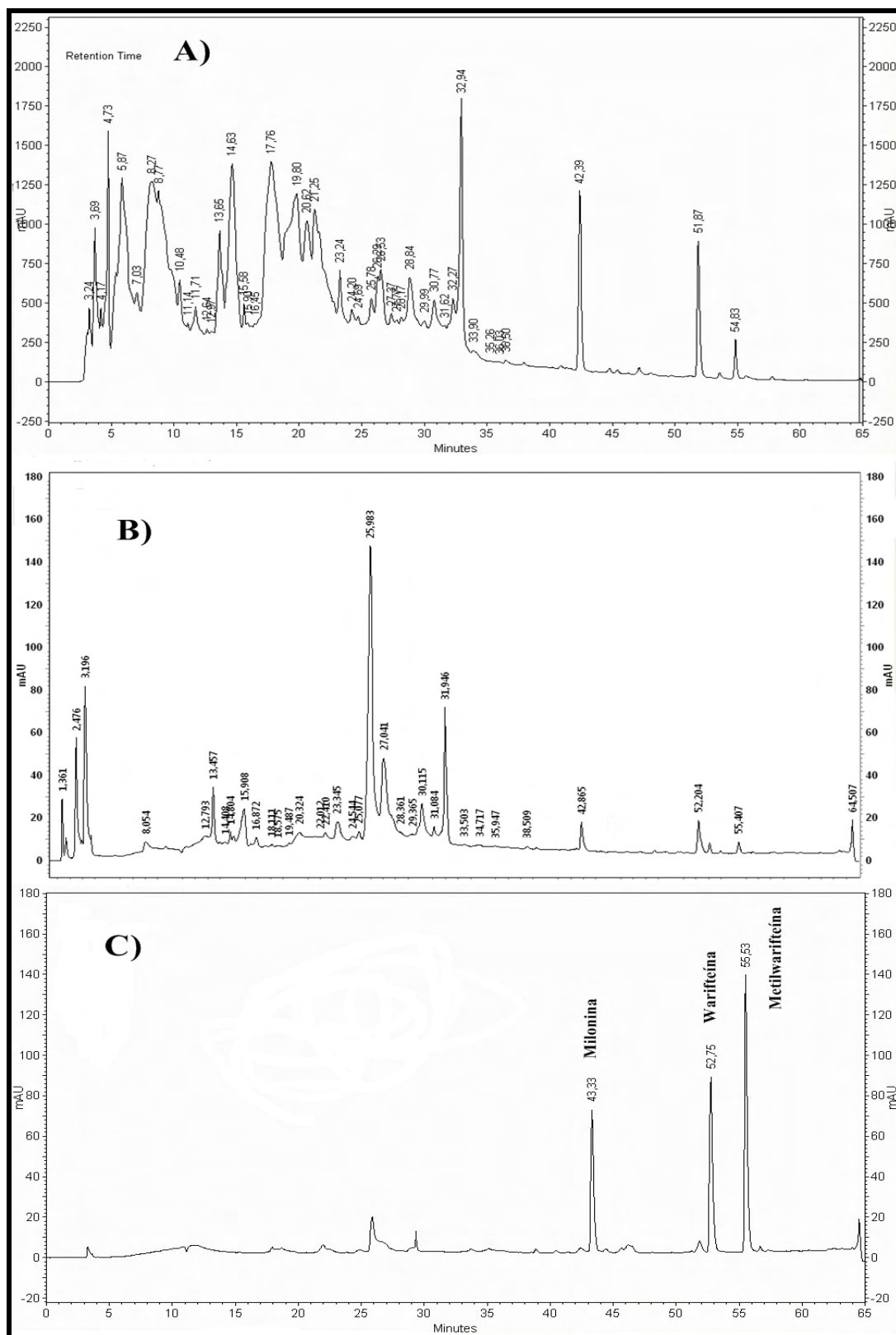


Figura 48: Fração aquosa do extrato (A), perfil cromatográfico do extrato sem adição (B) e cromatograma dos padrões a 100 µg/mL (C). Condições: fluxo 1 mL/min.; modo gradiente: 5-95% em H₂O (0,05% TEA) (A): MeOH (B); tempo: 65 min; λ = 278 nm.

11.3 Precisão e exatidão

Para o primeiro dia de análise da precisão e exatidão os resultados obtidos para a curva de calibração estão exibidos na Tabela 5. Como mostra a Figura 49 (pág. 103) as quantidades de milonina, warifteína e metilwarifteína encontradas no extrato após a regressão linear da equação da reta obtida foram de 7,82; 4,45 e 1,09 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A Figura 50 (pág. 104) mostra os resíduos obtidos com os dados da curva de calibração. Com este resultado o valor teórico obtidos no extrato para as concentrações Baixa (2), Média (50) e Alta (80) foram de 9,82; 57,82 e 87,82 $\mu\text{g/mL}$ para a milonina; 6,45; 54,45 e 84,45 para a warifteína e 3,09; 51,09 e 81,09 para a metilwarifteína, respectivamente.

A Tabela 6 mostra os valores das áreas dos picos cromatográficos para as concentrações Baixa, Média e Alta. Os resultados de precisão para a milonina foram de 2,33% para a concentração Baixa, 2,77 para a concentração Média e 2,24% para a concentração Alta como esta demonstrada na Tabela 7. Já para a exatidão os valores foram de 102,83% para a Baixa, 100,08% para a Média e 103,15% para a Alta. Para a warifteína os resultados de precisão foram de 5,09% na Baixa, 3,63% na Média e 1,86% na Alta. Os valores de exatidão foram de 113,96% para a Baixa, 95,40 para a Média e 98,16 para a Alta. E para a metilwarifteína os valores de precisão foram de 6,42% para a Baixa, 2,72% para a Média e 1,49% para a Alta. Enquanto os valores de exatidão foram de 114,73% para a Baixa, 94,41% para a Média e 98,76 para a Alta. Todos os resultados estão dentro das especificações estabelecidas pela RE899 da ANVISA para métodos bioanalíticos que estipula para a precisão um desvio de no máximo 15% e para a exatidão de 85-115%. A Figura 51 (pág. 106) mostra um dos cromatogramas obtido para o primeiro dia de análise de precisão e exatidão.

Tabela 5: Resultados da curva de calibração para o primeiro dia de precisão e exatidão.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	175614	134664	45178
2	2	210244	170490	74834
3	10	381370	330199	205658
4	20	578829	542309	390446
5	30	819369	749344	574402
6	50	1196064	1168319	909820
7	100	2302707	2404539	1932920
Inclinação		21240 ± 212.5	22620 ± 478.0	18820 ± 352.5
Intercepto de Y quando X=0		166000 ± 9473	100600 ± 21300	20430 ± 15710
Intercepto de X quando Y=0		- 7,817	- 4,449	-1,086
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		20690 to 21780	21390 to 23850	17920 to 19730
Intercepto de X quando Y=0.0		-9.135 to -6.550	-7.150 to -1.955	-3.344 to 1.027
r ²		0,9995	0,9978	0,9982
F		9983	2239	2851
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções em duplicatas das amostras.

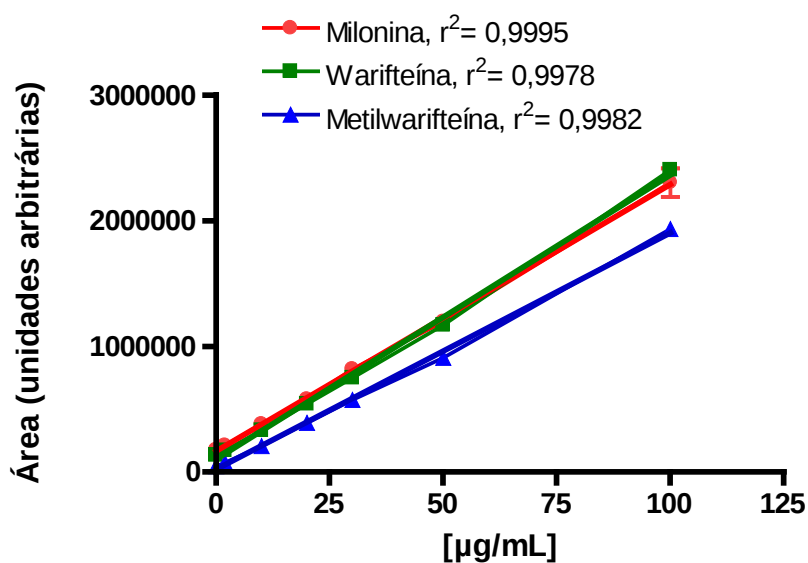


Figura 49: Curva de calibração obtida no primeiro dia de precisão e exatidão.

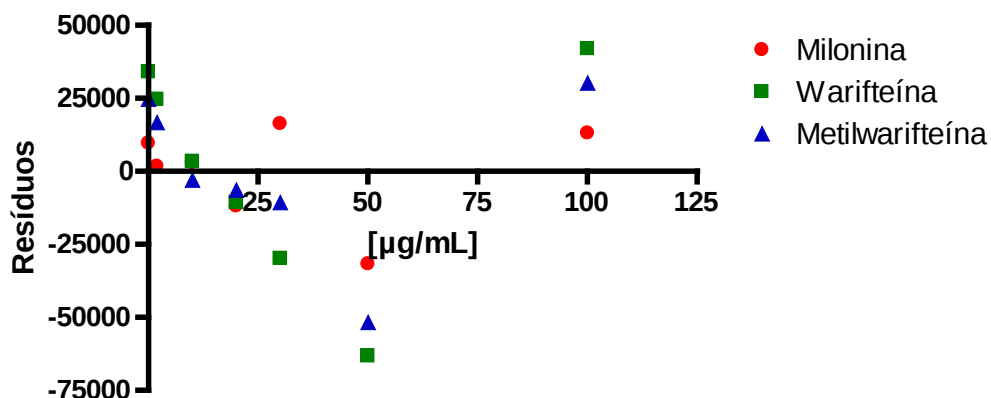


Figura 50: Gráfico de resíduos do primeiro dia de precisão e exatidão.

Tabela 6: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o primeiro dia de análise.

Nº de replicatas	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	80 µg/mL (Área)
Milonina			
1	217168	1245039	1972301
2	210211	1206481	1960539
3	210276	1185647	1886718
4	212554	1233554	1875032
5	221745	1273364	1923648
Warifteína			
1	143560	1159346	1908867
2	166469	1160782	1889712
3	158685	1175855	1848823
4	154721	1105756	1819336
5	151681	1225133	1866685
Metilwarifteína			
1	64584	917793	1533821
2	66151	901846	1519288
3	60057	874374	1497914
4	71893	898434	1474153
5	64134	941137	1506294

Tabela 7: Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no primeiro dia de análise.

	Milonina			Warifteína			Metilwarifteína		
	9,82 µg/mL	57,82 µg/mL	87,82 µg/mL	6,45 µg/mL	54,45 µg/mL	84,45 µg/mL	3,09 µg/mL	51,09 µg/mL	81,09 µg/mL
1	10,23	58,63	92,88	6,84	51,68	84,76	3,50	48,82	81,55
2	9,90	56,82	92,32	7,86	51,74	83,92	3,59	47,98	80,77
3	9,90	55,83	88,85	7,51	52,41	82,11	3,26	46,52	79,64
4	10,01	58,09	88,30	7,34	49,31	80,81	3,89	47,80	78,38
5	10,44	59,97	90,59	7,20	54,58	82,90	3,48	50,06	80,08
Média	10,10	57,87	90,59	7,35	51,95	82,90	3,55	48,24	80,08
DP	0,23	1,60	2,03	0,37	1,88	1,54	0,23	1,31	1,20
DPR%	2,33	2,77	2,24	5,09	3,63	1,86	6,42	2,72	1,49
Exatidão%	102,83	100,08	103,15	113,96	95,40	98,16	114,73	94,41	98,76

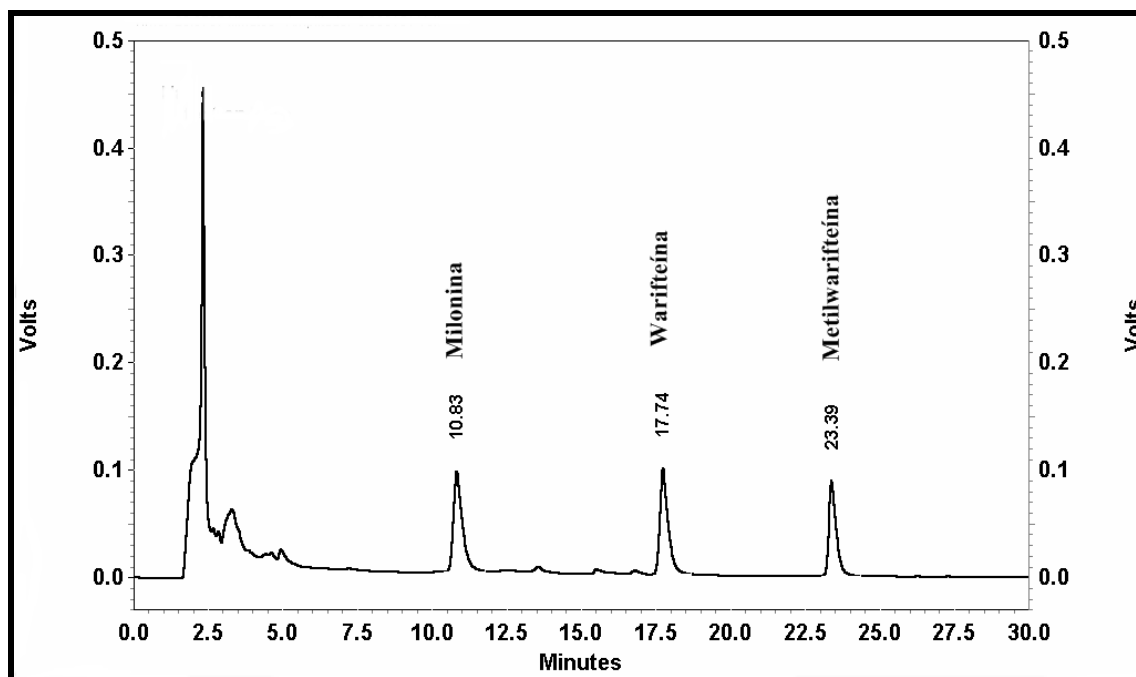


Figura 51: Cromatograma do extrato adicionado de 80 $\mu\text{g/mL}$ de marcadores no primeiro dia de análise de precisão e exatidão.

Para o segundo dia de análise os resultados obtidos com a curva de calibração estão demonstrados na Tabela 8. As quantidades de marcadores encontrados na amostra de extrato foram de 7,24 $\mu\text{g/mL}$ para a milonina, 5,89 $\mu\text{g/mL}$ para a warifteína e 1,20 $\mu\text{g/mL}$ para a metilwarifteína como mostra a Figura 52 (pág. 108). A Figura 53 (pág. 108) mostra os resíduos obtidos com a segunda curva de calibração. A área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta estão demonstradas na Tabela 9. O valor teórico de milonina no extrato foi de 9,24 $\mu\text{g/mL}$ para a concentração Baixa, 57,24 $\mu\text{g/mL}$ para a concentração Média e 87,24 $\mu\text{g/mL}$ para a concentração Alta. Para a warifteína o valor teórico para as concentrações Baixa, Média e Alta foram, respectivamente, de 7,90 $\mu\text{g/mL}$, 55,90 $\mu\text{g/mL}$ e 85,90 $\mu\text{g/mL}$. Para a metilwarifteína o valor teórico encontrado foi de 3,20 $\mu\text{g/mL}$, 51,20 e 81,20 para as concentrações Baixa, Média e Alta, respectivamente.

Os resultados de precisão para a milonina foram de 2,39% (Baixa), 1,24% (Média) e 3,55% (Alta) como esta demonstrada na Tabela 10. Para a warifteína os valores de precisão calculados foram de 2,68% (Baixa), 3,58% (Média) e 1,12% (Alta). Para a metilwarifteína os resultados de precisão foram de 4,39% (Baixa), 2,86% (Média) e 3,52% (Alta). Os resultados da exatidão para a milonina foram de 110,12% (Baixa), 97,36% (Média) e 104,15% (Alta). Na warifteína os valores de exatidão foram de 102,16% (Baixa), 96,09% (Média) e 102,93% (Alta). Para a metilwarifteína os resultados foram de 114,70% (Baixa), 96,09% (Média) e 106,31% (Alta). Todos os resultados ficaram dentro das especificações estabelecidas pela RE899 da ANVISA para métodos bioanalíticos. A Figura 54 (pág. 111) mostra o cromatograma obtido para o segundo dia de análise de precisão e exatidão.

Tabela 8: Resultados da curva de calibração para o segundo dia de precisão e exatidão.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina	Warifteína	Metilwarifteína
		Área do pico ²	Área do pico ²	Área do pico ²
1	0	170343	135248	44571
2	2	211841	154444	67477
3	10	341115	296590	189865
4	20	567437	524152	379967
5	30	790331	719529	528267
6	50	1162191	1032171	870059
7	100	2271062	2099044	1808133
Inclinação		20990 ± 289.2	19590 ± 390.6	17640 ± 277.3
Intercepto de Y quando X=0		152000 ± 12890	115400 ± 17410	21120 ± 12360
Intercepto de X quando Y=0		-7,238	-5,892	-1,197
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		20250 to 21740	18590 to 20590	16930 to 18360
Intercepto de X quando Y=0.0		-9.049 to -5.521	-8.492 to -3.482	-3.085 to 0.5875
r ²		0,9991	0,9980	0,9988
F		5271	2515	4049
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções em duplicatas das amostras.

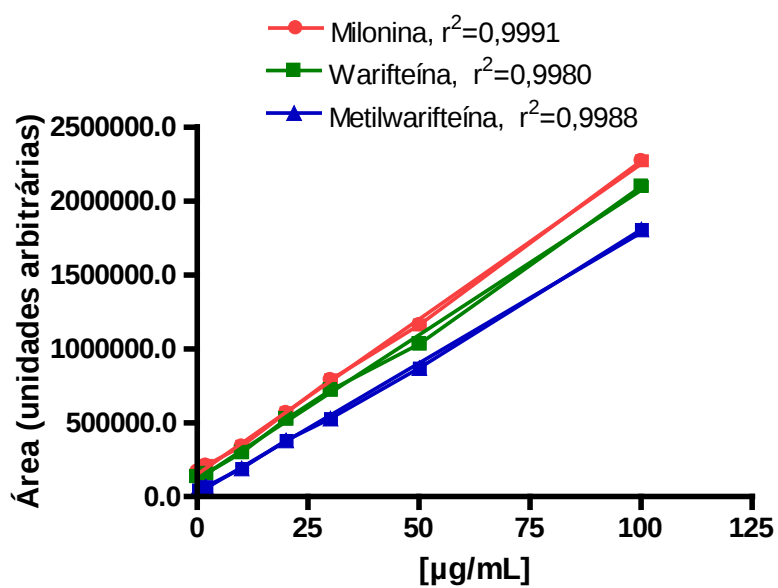


Figura 52: Curva de calibração obtida no segundo dia de precisão e exatidão.

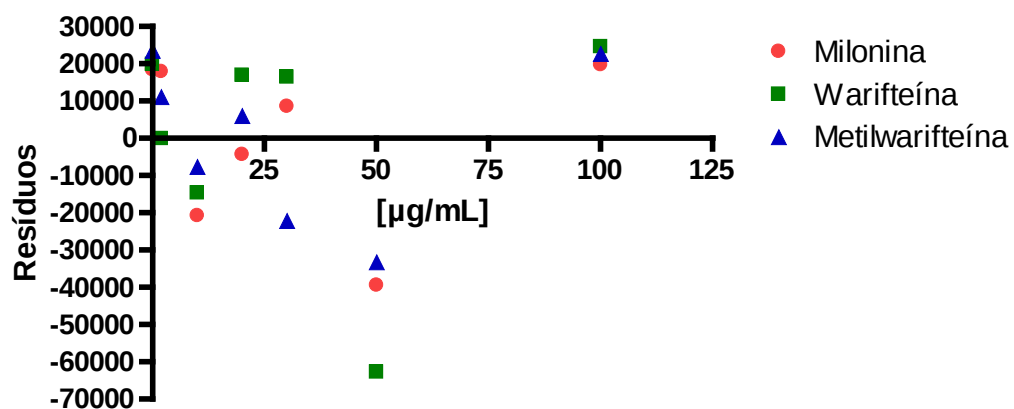


Figura 53: Gráfico de resíduos para a segunda curva de calibração na precisão e exatidão.

Tabela 9: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o segundo dia de análise.

N° de replicatas	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	80 µg/mL (Área)
Milonina			
1	218247	1170711	1926667
2	218156	1189636	1993111
3	215180	1174576	1906169
4	208502	1149806	1804117
5	207827	1165158	1907516
Warifteína			
1	159053	1103330	1699424
2	159738	1046874	1735663
3	150873	1065198	1743140
4	158015	999144	1749555
5	162081	1046247	1731946
Metilwarifteína			
1	61151	869150	1566124
2	64584	847824	1552034
3	66809	900244	1542549
4	68145	839873	1431430
5	62863	883064	1523034

Tabela 10: Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no segundo dia de análise.

	Milonina			Warifteína			Metilwarifteína		
	9,24 µg/mL	57,24 µg/mL	87,24 µg/mL	7,9 µg/mL	55,9 µg/mL	85,9 µg/mL	3,2 µg/mL	51,2 µg/mL	81,2 µg/mL
1	10,40	55,77	91,77	8,13	56,33	86,76	3,47	49,26	88,77
2	10,39	56,67	94,94	8,16	53,45	88,61	3,66	48,05	87,97
3	10,25	55,95	90,80	7,71	54,38	88,99	3,79	51,03	87,43
4	9,93	54,77	85,94	8,07	51,01	89,32	3,87	47,60	81,13
5	9,90	55,50	90,86	8,28	53,42	88,42	3,57	50,05	86,32
Média	10,18	55,73	90,86	8,07	53,72	88,42	3,67	49,20	86,32
DP	0,24	0,69	3,23	0,22	1,92	0,99	0,16	1,41	3,03
DPR%	2,39	1,24	3,55	2,68	3,58	1,12	4,39	2,86	3,52
Exatidão%	110,12	97,36	104,15	102,16	96,09	102,93	114,70	96,09	106,31

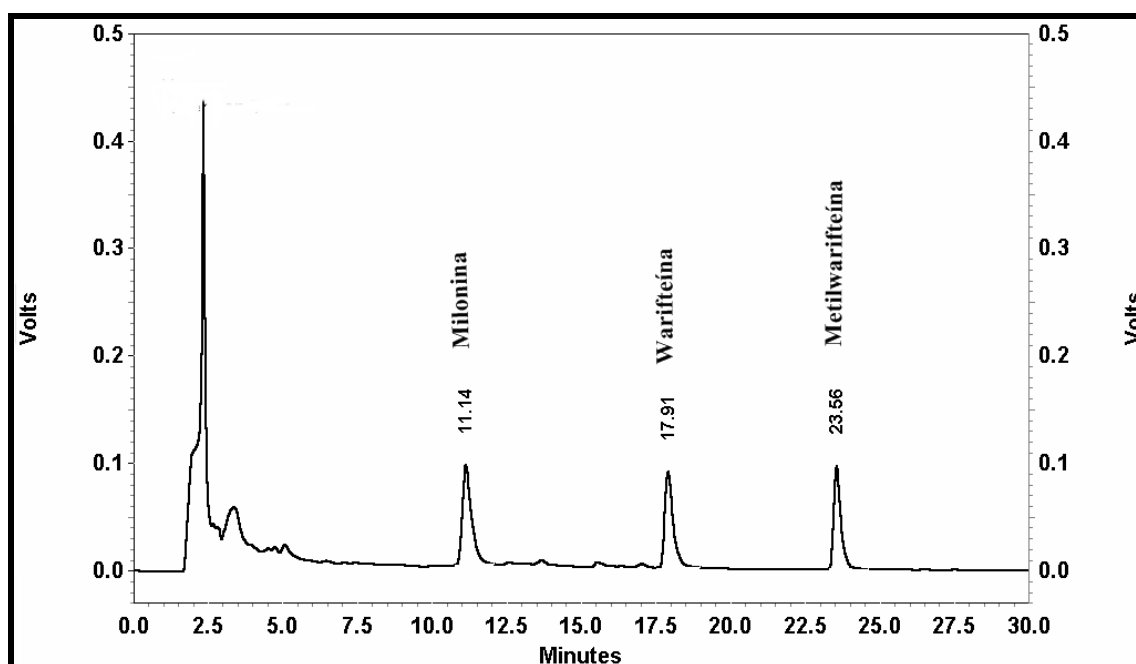


Figura 54: Cromatograma do extrato adicionado de 80 µg/mL de marcadores no segundo dia de análise de precisão e exatidão.

Para o terceiro dia de análise os resultados obtidos na curva de calibração estão demonstrados na Tabela 11. As quantidades de cada marcador encontrados no extrato foram de 8,68 µg/mL para a milonina, 5,43 µg/mL para a warifteína e 1,85 µg/mL para a metilwarifteína como mostra o na Figura 55 (pág. 113). A Figura 56 (pág. 1113) mostra os valores obtidos para os resíduos na terceira curva de calibração. A área dos picos cromatográficos obtidos para as concentrações Baixa, Média e Alta estão demonstradas na Tabela 12. O valor teórico de milonina encontrado no extrato foi de 10,68 µg/mL para a concentração Baixa, 58,68 µg/mL para a concentração Média e 88,68 µg/mL para a concentração Alta. Para a warifteína o valor teórico nas concentrações Baixa, Média e Alta foram, respectivamente, 7,43 µg/mL, 55,43 µg/mL e 85,43 µg/mL. Na metilwarifteína os valores teóricos foram de 3,85 µg/mL (Baixa), 51,85 µg/mL (Média) e 81,85 µg/mL (Alta).

Os resultados obtidos da precisão para a milonina foram de 3,11% (Baixa), 4,35% (Média) e 1,36% (Alta) como esta demonstrada na Tabela 13 Para a warifteína os resultados foram de 3,15% (Baixa), 3,59% (Média) e 0,90% (Alta). Na metilwarifteína os resultados de precisão foram 2,09% (Baixa), 1,56% (Média) e 1,75% (Alta). Os resultados obtidos de exatidão para a milonina foram de 106,52% (Baixa), 98,56% (Média) e 100,67% (Alta). Para a warifteína os resultados foram 108,44% (Baixa), 99,16% (Média) e 103,99% (Alta). Já para a metilwarifteína a exatidão ficou em 108,94% (Baixa), 101,78% (Média) e 102,21% (Alta). A Figura 57 (pág. 1116) mostra o cromatograma obtido no terceiro dia de análise de precisão e exatidão.

Tabela 11: Resultados da curva de calibração para o terceiro dia de precisão e exatidão.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	192135	136569	47322
2	2	244698	173209	77263
3	10	388643	319010	200290
4	20	604945	516305	393713
5	30	816323	723576	584847
6	50	1173969	1112489	972522
7	100	2312731	2219859	1877807
Inclinação		21020 ± 360.8	20800 ± 310.6	18470 ± 154.8
Intercepto de Y quando X=0		182500 ± 16080	113000 ± 13840	34160 ± 6899
Intercepto de X quando Y=0		-8,68	-5,43	-1,85
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		20090 to 21950	20000 to 21600	18070 to 18860
Intercepto de X quando Y=0.0		-11.01 to -6.51	-7.34 to -3.62	-2.85 to -0.87
r ²		0,9985	0,9989	0,9996
F		3394	4485	14230
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Médias das injeções em duplicatas das amostras.

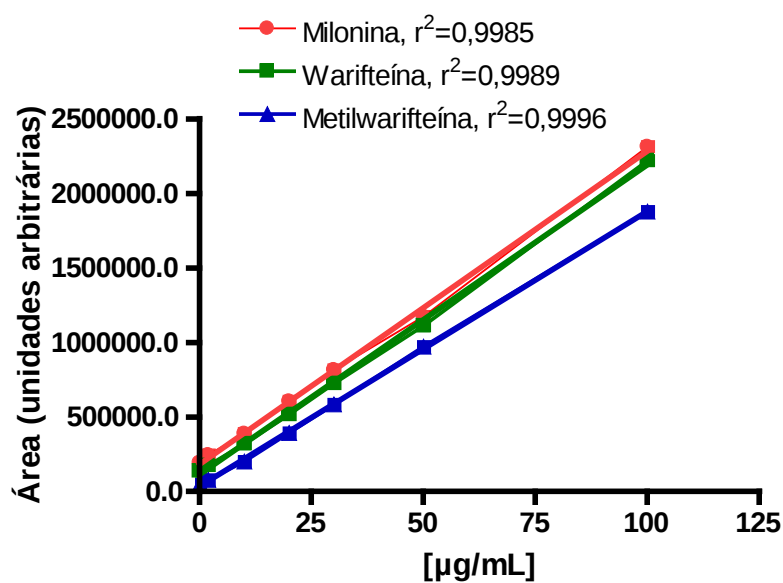


Figura 55: Curva de calibração obtida no terceiro dia de precisão e exatidão.

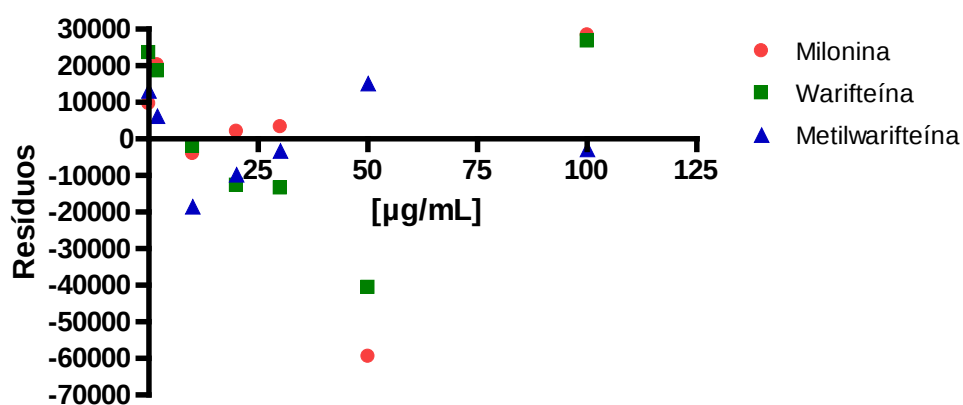


Figura 56: Gráfico de resíduos obtidos com a terceira curva de calibração na precisão e exatidão.

Tabela 12: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta para o terceiro dia de análise de precisão e exatidão.

N° de replicatas	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	80 µg/mL (Área)
Milonina			
1	236007	1261517	1866189
2	240644	1283481	1850722
3	229737	1183829	1901300
4	239292	1173001	1858082
5	250104	1174936	1906064
Warifteína			
1	165452	1163607	1835827
2	162951	1204842	1827799
3	163509	1123702	1870135
4	171489	1101066	1850728
5	174929	1123912	1855590
Metilwarifteína			
1	77431	960378	1514844
2	76591	1000047	1546728
3	75235	971731	1567718
4	78659	966796	1519848
5	79291	973313	1574409

Tabela 13 Valores obtidos para a precisão e exatidão intradia no terceiro dia de análise.

	Milonina			Warifteína			Metilwarifteína		
	10,68 µg/mL	58,68 µg/mL	88,68 µg/mL	7,43 µg/mL	55,43 µg/mL	85,43 µg/mL	3,85 µg/mL	51,85 µg/mL	81,85 µg/mL
1	11,23	60,02	88,78	7,95	55,94	88,25	4,19	52,01	82,04
2	11,45	61,06	88,05	7,83	57,92	87,87	4,15	54,16	83,77
3	10,93	56,32	90,45	7,86	54,02	89,90	4,07	52,63	84,90
4	11,38	55,80	88,40	8,24	52,93	88,97	4,26	52,36	82,31
5	11,90	55,90	90,68	8,41	54,03	89,20	4,29	52,71	85,26
Média	11,38	57,82	89,27	8,06	54,97	88,84	4,19	52,77	83,66
DP	0,35	2,52	1,21	0,25	1,97	0,80	0,09	0,82	1,46
DPR%	3,11	4,35	1,36	3,15	3,59	0,90	2,09	1,56	1,75
Exatidão%	106,52	98,53	100,67	108,44	99,16	103,99	108,94	101,78	102,21

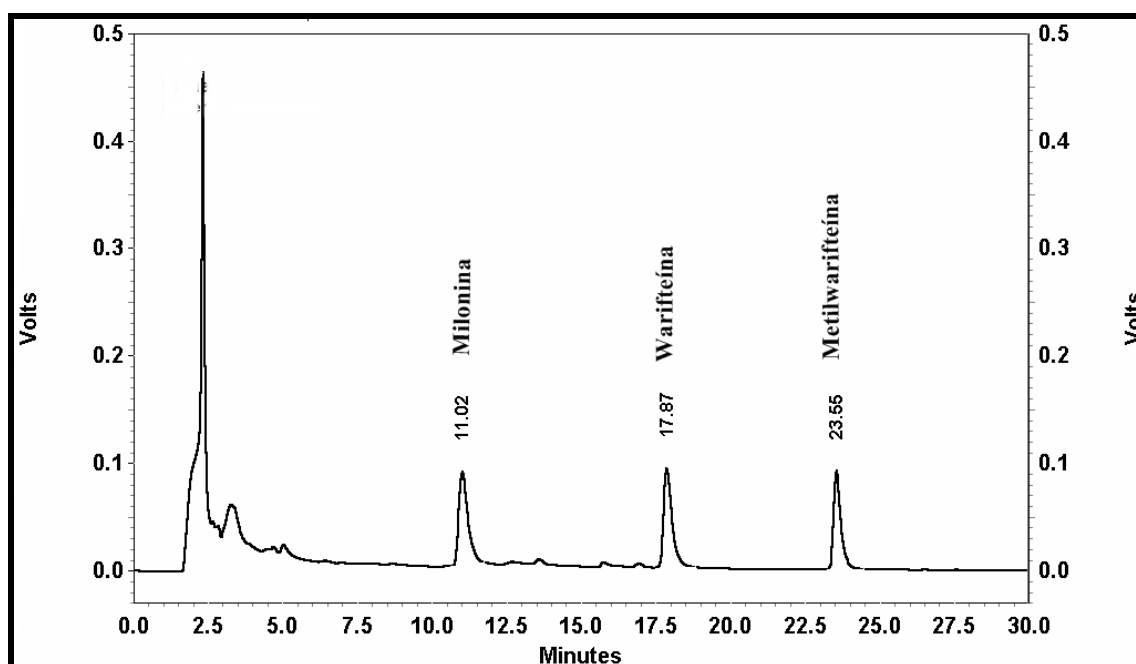


Figura 57: Cromatograma do extrato adicionado de 80 µg/mL de marcadores no segundo dia de análise de precisão e exatidão.

Reunindo os dados de precisão e exatidão para os três dias de análise foi calculado a média como esta exibido na Tabela 14. Os resultados da precisão interdias para a milonina foram de 2,61% (Baixa), 2,79% (Média) e 2,38% (Alta). Para a warifteína a precisão interdias foi 3,64% (Baixa), 3,60% (Média) e 1,29% (Alta). Os valores de precisão interdias para a metilwarifteína foram 4,30% (Baixa), 2,38% (Média) e 2,25% (Alta). Já em relação a exatidão (bias) interdias os valores obtidos para a milonina foram 106,49% (Baixa), 98,66% (Média) e 102,66% (Alta). Para a warifteína os resultados foram de 108,19% (Baixa), 96,88% (Média) e 101,96% (Alta) e para a metilwarifteína 112,79% (Baixa), 97,43% (Média) e 102,43% (Alta).

Tabela 14: Precisão intra e interdia (DPR%) e exatidão (bias) do método.

	2 µg/mL	50 µg/mL	80 µg/mL
	(DPR %, n=5;	(DPR %, n=5;	(DPR %, n=5;
Dia	bias %, n=5)	bias %, n=5)	bias %, n=5)
Milonina			
1	2,33; 102,83	2,77; 100,08	2,24; 103,15
2	2,39; 110,12	1,24; 97,36	3,55; 104,15
3	3,11; 106,52	4,35; 98,53	1,36; 100,67
Média	2,61; 106,49	2,79; 98,66	2,38; 102,66
Warifteína			
1	5,09; 113,96	3,63; 95,40	1,86; 98,16
2	2,68; 102,16	3,58; 96,09	1,12; 102,93
3	3,15; 108,44	3,59; 99,16	0,90; 103,99
Média	3,64; 108,19	3,60; 96,88	1,29; 101,69
Metilwarifteína			
1	6,42; 114,73	2,72; 94,41	1,49; 98,76
2	4,39; 114,70	2,86; 96,09	3,52; 106,31
3	2,09; 108,94	1,56; 101,78	1,75; 102,21
Média	4,30; 112,79	2,38; 97,43	2,25; 102,43

11.4 Robustez

A Tabela 15 mostra a média da área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa (2 µg/mL), Média (50 µg/mL) e Alta (100 µg/mL) para os três marcadores milonina, warifteína e metilwarifteína obtidas com a metodologia usada durante o desenvolvimento e validação do método analítico descrito no capítulo de “Desenvolvimento do método analítico”. Estas medidas foram usadas para calcular o coeficiente de variação das concentrações Baixa, Média e Alta por meio da mudança de alguns parâmetros considerados importantes na validação do método.

Tabela 15: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com os parâmetros obtidos na validação.

Nº de injeções	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	100 µg/mL (Área)
Milonina			
1	536742	2832181	5840722
2	473068	2857947	5873397
3	483109	2884114	5868467
Média	497640	2858081	5860862
Warifteína			
1	486487	3021015	6396445
2	485780	3010884	6437933
3	495259	3044452	6421886
Média	489175	3025450	6418755
Metilwarifteína			
1	188672	2153654	4628839
2	189995	2149785	4654456
3	195467	2167358	4643901
Média	191378	2156932	4642399

A Tabela 16 mostra os valores do coeficiente de variação (CV%) obtidos para a milonina com a diminuição da temperatura para 38°C que foram de 6,96% (Baixa), 7,16% (Média) e 3,16% (Alta). Para a warifteína o CV% a 38°C das concentrações Baixa, Média e Alta foram, respectivamente 5,88%; 5,36% e 0,36%. E para a metilwarifteína os resultados do CV% (38°C) foram de 12,55% (Baixa), 4,25% (Média) e 5,77% (Alta).

Tabela 16. Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a temperatura de 38°C.

Nº de injeções	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	100 µg/mL (Área)
Milonina			
1	589187	3078780	6107656
2	506703	3051418	5981108
3	501006	3057729	6049439
Média	532299	3062642	6046068
CV%	6,96	7,16	3,16
Warifteína			
1	522403	3211290	6510802
2	515230	3182846	6372582
3	516138	3168697	6442453
Média	517924	3187611	6441946
CV%	5,88	5,36	0,36
Metilwarifteína			
1	216120	2266352	4959466
2	215343	2247979	4859086
3	214751	2231537	4912802
Média	215405	2248623	4910451
CV%	12,55	4,25	5,77

A Tabela 17 demonstra os valores obtidos na robustez com a variação da temperatura para 42°C. Para milonina o CV% foi de 13,80% (Baixa), 8,70% (Média) e 4,46% (Alta). Enquanto para a warifteína o CV% foi de 16,81%, 6,77% e 2,15% para as concentrações Baixa, Média e Alta, respectivamente. E para a metilwarifteína os resultados foram de 15,41% (Baixa), 5,08% (Média) e 8,64% (Alta).

Tabela 17: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a temperatura de 42°C.

Nº de injeções	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	100 µg/mL (Área)
Milonina			
1	620426	3089912	6146933
2	539861	3146074	6106764
3	538674	3084307	6113644
Média	566320	3106764	6122447
CV%	13,80	8,70	4,46
Warifteína			
1	572408	3229685	6576304
2	574198	3254775	6548887
3	567611	3205961	6544873
Média	571406	3230140	6556688
CV%	16,81	6,77	2,15
Metilwarifteína			
1	222721	2267618	5063376
2	223090	2282631	5044940
3	216801	2249224	5022170
Média	220871	2266491	5043495
CV%	15,41	5,08	8,64

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos na robustez para a coluna C-8. Os resultados do CV% para as concentrações Baixa, Média e Alta para a milonina foram de 16,98%, 10,89% e 3,25%. Já para a warifteína os valores ficaram em 17,28% (Baixa), 7,19% (Média) e 5,19% (Alta). E para a metilwarifteína os resultados foram de -1,08% (Baixa), 4,42% (Média) e 12,96% (Alta).

Tabela 18: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a coluna C-8.

Nº de injeções	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	100 µg/mL (Área)
Milonina			
1	567577	3070521	6014533
2	596662	3126466	6018455
3	582120	3311382	6120588
Média	582120	3169456	6051192
CV%	16,98	10,89	3,25
Warifteína			
1	568322	3337207	6658922
2	579044	3256301	6744532
3	573683	3135626	6852122
Média	573683	3243045	6751859
CV%	17,28	7,19	5,19
Metilwarifteína			
1	168662	2350332	5205687
2	209979	2260851	5214587
3	189321	2145689	5312477
Média	189321	2252291	5244250
CV%	-1,08	4,42	12,96

A Tabela 19 demonstra os resultados obtidos na robustez para a concentração de 0,1% de Trietilamina (TEA) na fase móvel. Os valores de CV% para a milonina foram de 17,61% (Baixa), 15,63% (Média) e 16,66% (Alta). Para a warifteína os resultados foram de 15,40% (Baixa), 17,85% (Média) e 17,19% (Alta). Para a metilwarifteína os valores de CV% foram de 17,96% (Baixa), 19,53% (Média) e 16,31% (Baixa).

Tabela 19: Área dos picos cromatográficos das concentrações Baixa, Média e Alta na avaliação da robustez com a fase móvel a 0,1% de trietilamina (TEA).

Nº de injeções	2 µg/mL (Área)	50 µg/mL (Área)	100 µg/mL (Área)
Milonina			
1	586470	3299732	6845635
2	597767	3562426	6839442
3	571560	3052444	6827632
Média	585266	3304867	6837570
CV%	17,61	15,63	16,66
Warifteína			
1	587996	3556242	7321204
2	547501	3581102	7676654
3	558034	3556226	7567902
Média	564510	3564523	7521920
CV%	15,40	17,82	17,19
Metilwarifteína			
1	230997	2563181	5522165
2	224184	2591289	5387704
3	222054	2579866	5288879
Média	225745	2578112	5399583
CV%	17,96	19,53	16,31

Os resultados de robustez mostram que a maior variação foi para a mudança na concentração da trietilamina (0,1%) na fase móvel que foi de 19,53% na concentração Média em relação à metilwarifteína. Enquanto a menor variação foi na mudança de temperatura para 38°C que foi de 0,36% em relação à warifteína na concentração Alta. A Figura 58 mostra um dos cromatogramas obtidos no estudo da robustez.

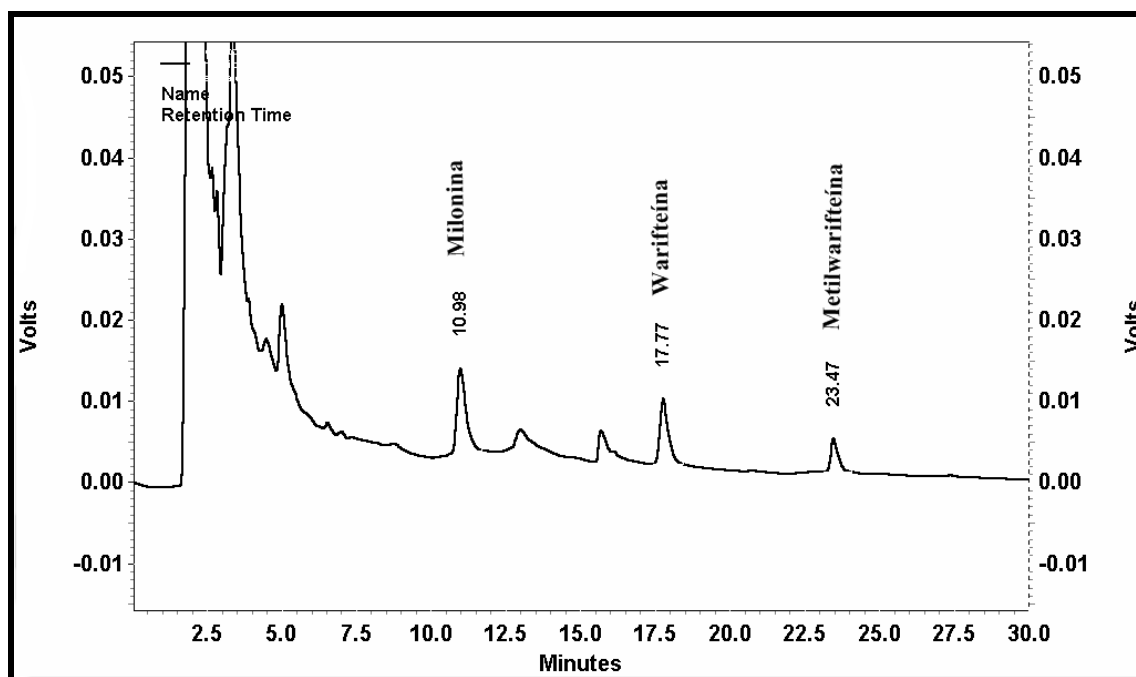


Figura 58: Cromatograma do extrato adicionado de 2 µg/mL de marcadores no estudo da robustez do método.

11.5 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para o estudo do LOD e do LOQ. A estimativa para o limite de detecção da milonina foi de 1,77 µg/mL, para a warifteína de 0,39 µg/mL e para a metilwarifteína de 1,10 µg/mL. Enquanto que a estimativa para o limite de quantificação da milonina foi de 5,90 µg/mL, para a warifteína de 1,31 µg/mL e para a metilwarifteína de 3,65 µg/mL.

Tabela 20: Valores de LOD e LOQ estimados a partir das curvas de calibração obtidas no estudo da linearidade

Parâmetros	Milonina	Warifteína	Metilwarifteína
Inclinação			
1	20943	20862	18361
2	21516	21777	18267
3	20501	19840	17197
Média	20987	20826	17942
Intercepto			
1	183311	112231	37382
2	164175	107061	25490
3	160130	111177	26679
DP	12382	2732	6550
LOD	1,77	0,39	1,10
LOQ	5,90	1,31	3,65

11.6 Estudo de estabilidade a temperatura ambiente

A Tabela 21 mostra as áreas dos picos cromatográficos obtidos após a preparação das amostras, enquanto a Tabela 22 mostra as áreas dos picos cromatográficos obtidos depois de passar 8 horas à temperatura ambiente juntamente com os resultados dos coeficientes de variação. Para a milonina a variação da concentração de 4 µg/mL foi de 4,33% e a concentração de 80 µg/mL de 0,98%. Na warifteína a concentração de 4 µg/mL teve uma variação de 0,31% e para a concentração de 80 µg/mL de 4,16%. E para a metilwarifteína a concentração de 4 µg/mL teve uma variação de -2,89% e na concentração de 80 µg/mL de 1,92%.

Tabela 21: Área dos picos cromatográficos obtidos logo após a preparação das amostras no estudo de estabilidade a temperatura ambiente.

Nº de injeções	4 µg/mL	80 µg/mL
Milonina		
1	727782	5071936
2	700845	5340778
3	653262	5432838
Média	693963	5281851
Warifteína		
1	652173	5643044
2	848037	5746747
3	892060	5864328
Média	797423	5751373
Metilwarifteína		
1	332041	3951155
2	365530	4092865
3	330245	4144084
Média	342605	4062701

Tabela 22: Área dos picos cromatográficos obtidos após um tempo de 8 horas a temperatura ambiente e os seus coeficientes de variação.

Nº de injeções	4 µg/mL	80 µg/mL
Milonina		
1	777621	5378875
2	731073	5466102
3	663434	5156056
Média	724043	5333678
CV%	4,33	0,98
Warifteína		
1	663489	5929604
2	831742	6039331
3	904487	6003257
Média	799906	5990731
CV%	0,31	4,16
Metilwarifteína		
1	334594	4160517
2	342914	4212781
3	320564	4049191
Média	332691	4140830
CV%	-2,89	1,92

A Figura 59 (pág. 127) mostra um dos cromatogramas obtidos no estudo de estabilidade à temperatura ambiente após 8 horas de intervalo entre a preparação e a injeção demonstrando que não houve surgimento de produtos de degradação.

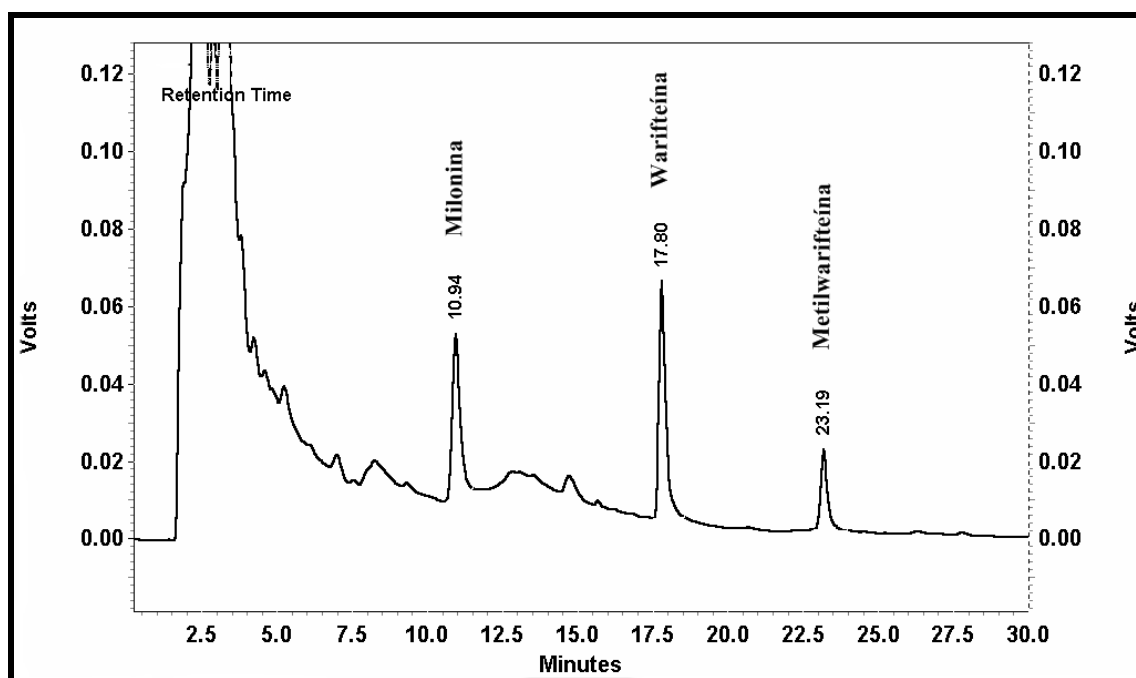


Figura 59: Cromatograma do extrato adicionado de 4 $\mu\text{g/mL}$ de marcadores no estudo de estabilidade a temperatura ambiente após 8 horas de sua preparação.

11.7 Degradação ácida

Neste estudo de degradação ácida foi verificada a especificidade e estabilidade da milonina, warifteína e metilwarifteína a hidrólise ácida e temperatura. Como pode ser observado no cromatograma da Figura 60 (B) (pág. 128) onde ocorreu o processo de degradação ácida, a milonina, warifteína e metilwarifteína não sofreram nenhum tipo de alteração na simetria dos picos cromatográficos quando comparados com o cromatograma da Figura 60 (A) (pág. 128) onde a amostra não sofreu o processo de degradação.

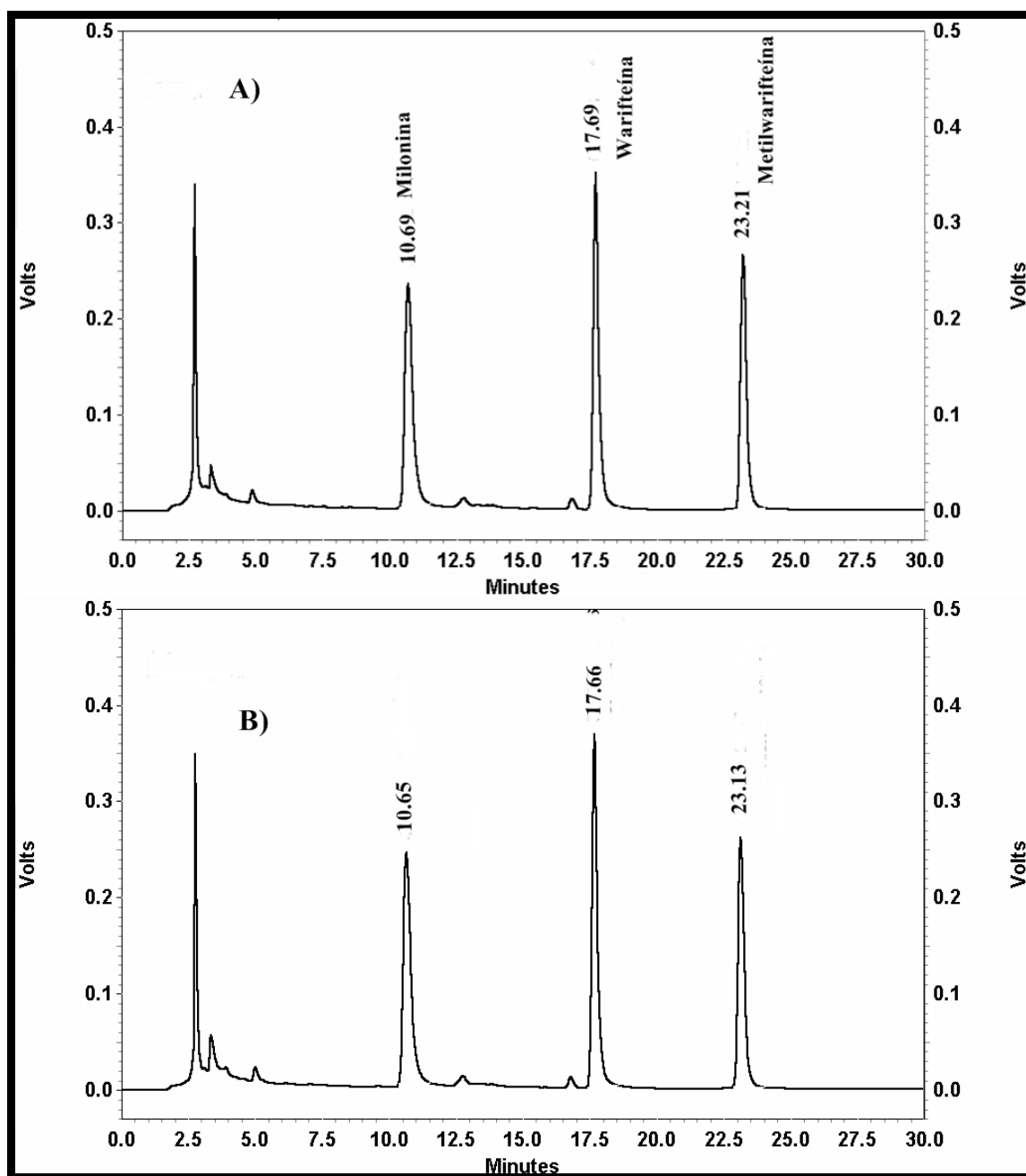
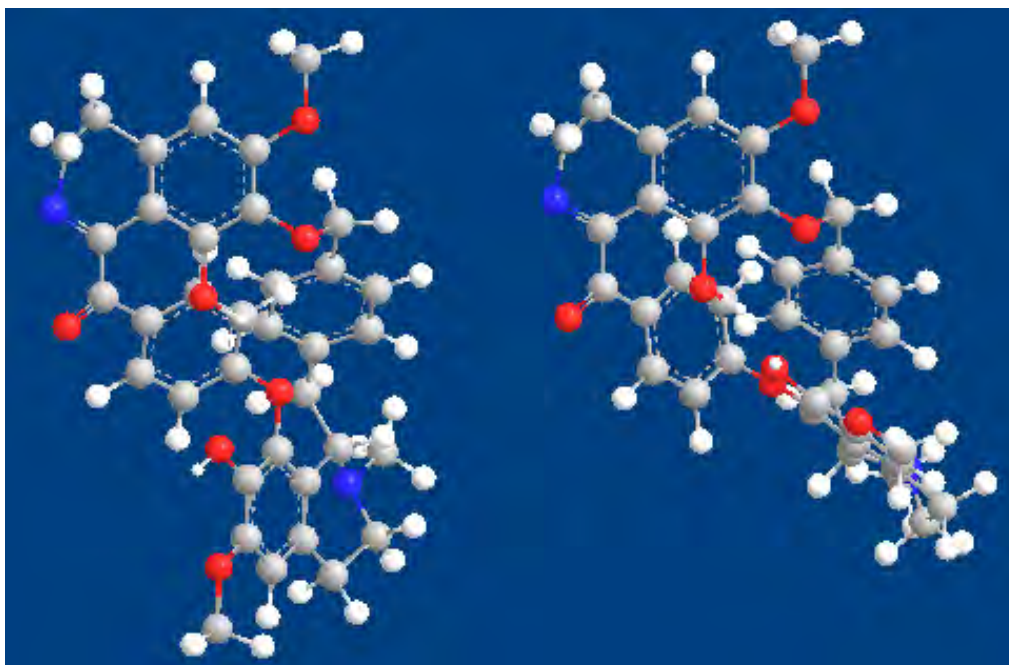


Figura 60: Cromatograma do extrato filtrado adicionado de milonina, warifteína e metilwarifteína padrão a 100 $\mu\text{g/mL}$ cada. (A) amostra não submetida à degradação ácido e (B) amostra submetida à degradação ácido.



Capítulo IV

Sazonalidade

12. INTRODUÇÃO

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter - e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais. A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarina, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (GOBBO-NETO, 2007).

Em estudo realizado para avaliar a variação sazonal no conteúdo total de iridóides em *Antirrhinum majus* foi encontrado que no início da floração ocorreu um declínio no conteúdo destes metabólitos secundários nas folhas da planta. Uma das hipóteses apresentadas para este fenômeno foi o deslocamento da biossíntese dos iridóides das folhas para outras partes da planta, por exemplo, inflorescências como resultante da falta de iridóides nas folhas durante o desenvolvimento das flores (HØGEDAL & MØLGAARD, 2000). Também foi encontrada variação sazonal no conteúdo de taxóides com atividade anticancerígena na espécie *Taxus bacata*. Segundo os autores essas variações nos níveis de taxóides poderiam estar relacionadas com o desenvolvimento das flores na planta e em mudanças na rota biossintética (HOOK et al, 1999).

Um outro estudo realizado para avaliar a atividade antineoplásica de *Alstonia scholaris*, as células foram tratadas com diferentes doses de várias fases orgânicas em três épocas do ano: monção, inverno e verão. O maior efeito de morte celular foi observado no extrato preparado no verão. Estudos demonstraram que os extratos preparados no verão continham alcalóides que foram altamente efetivos na morte celular (JAGETIA & BALIGA, 2005).

A psicolatina é um alcalóide indólico produzido por *Psychotria umbellata* com atividade analgésica, ansiolítica, antipsicótica e antimutagênica. Foi encontrado que as maiores concentrações deste alcalóide se encontra nas folhas, seguida dos caules, e as raízes que possuem a menor concentração. Porém, no período reprodutivo com o surgimento das inflorescências o acumulo de alcalóides foi maior nos tecidos reprodutivos fazendo com que a concentração dos alcalóides nos tecidos vegetativos diminuísse. E no início da frutificação o conteúdo de alcalóides foi menor que nos estágios anteriores. Uma das hipóteses é que houve um transporte dos alcalóides dos tecidos vegetativos para os tecidos reprodutivos. Esse padrão pode fornecer plantas com maior capacidade de suportar estresses ambientais, garantindo o sucesso na reprodução (PARANHOS *et al*, 2009).

13. MATERIAIS E MÉTODO

13.1 Reagentes e materiais

- Metanol grau HPLC, MERCK;
- Álcool etílico 95% P.A-ACS (Quimex);
- Trietilamina, (MERCK);
- Água purificada (Elga Purelab Option-Q);
- Filtros para seringa com 0,45 µm de diâmetro de poro;
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência constituído de bomba LC-10 Advp, detector SPD-10AVvp, autoinjeter SIL-10Advp, forno CTO-10ASvp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14A, todos os módulos da SHIMADZU;
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência constituído de uma bomba LC-10 Advp, detector SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14A, todos da Shimadzu;

13.2 Obtenção dos extratos para o estudo da sazonalidade

Para o estudo da sazonalidade amostras das folhas de 5 espécimes individuais de *Cissampelos sympodialis* foram coletadas no horto do Centro de Biotecnologia durante um período de nove meses intercalados. Os seguintes meses foram: Outubro e dezembro de 2009, Fevereiro, Abril e Junho de 2010.

O material vegetal foi colocado para secar em estufa de ar circulante a $45 \pm 3^\circ\text{C}$, durante um período de 24 horas. Após secagem o material foi triturado em moinho e tamisado em tamis com malha nº 14 (1.2 mm). Uma quantidade correspondente a 100 g foi pesado em balança analítica e submetido à extração durante 5 minutos com 450 mL de etanol 96°GL em um liquidificador. A solução extrativa foi quantitativamente transferido para recipientes de vidro com tampas com um volume adicional de 50 mL de etanol. Esta solução extrativa foi deixada durante três dias consecutivos em extração, protegido da luz e com agitação todos os dias. A solução extrativa foi depois filtrada com papel de filtro e amostras de 250 mL desta solução filtrada foram medidas em uma proveta e concentrada em evaporador rotatório a 60°C .

13.3 Quantificação dos marcadores nos extratos obtidos.

Para cada mês foram preparadas três amostras de extratos ($n=3$) que foram quantificadas através das curvas de calibração com a metodologia usada na validação do método nas concentrações de 0, 2, 10, 20, 30, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$. As áreas das amostras foram usadas na equação da reta obtida na curva de calibração para obter as concentrações de cada extrato preparado. O teste estatístico “Anova one way” com pós-teste de Bonferroni entre grupos foi usado para calcular as diferenças de concentração dos marcadores entre cada mês de estudo. Os resultados foram julgados da seguinte forma em relação ao valor de P: $P<0,05$ (*); $P<0,01$ (**); $P<0,001$ (***) e $P>0,05$ (ns).

13.4 Metodologia de preparação da FAT dos frutos da milona

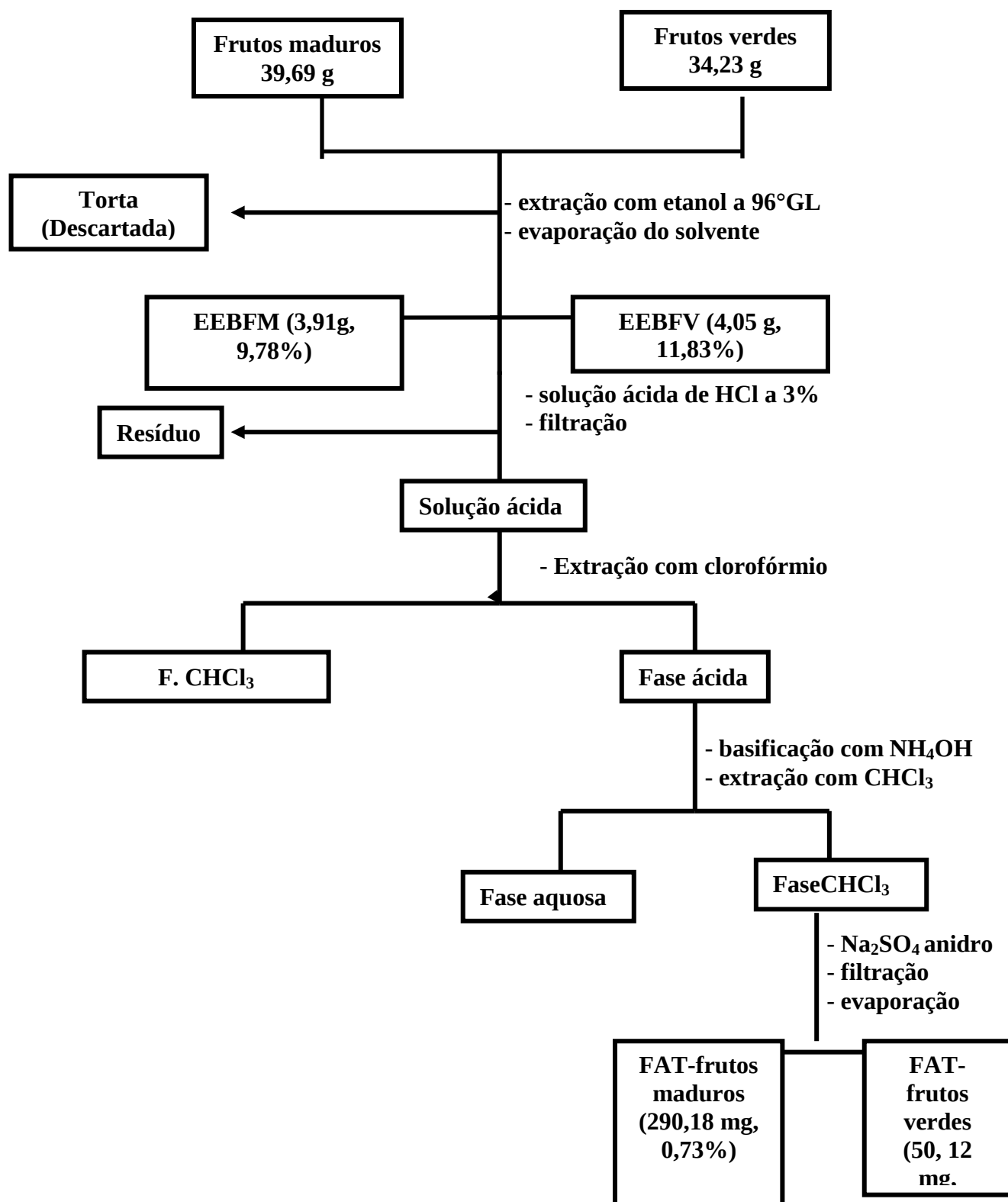
Os frutos foram coletados no próprio horto do CBiotec. Depois de coletados eles foram separados de acordo com seu estado de maturação e pesados em balança analítica resultando em 39,96 g para os maduros e 34,23 g para os verdes (Esquema 3, pág. 133).

Os frutos foram triturados em um liquidificador usando como solvente o etanol a 96°GL durante 3 minutos cada. O copo do liquidificador foi lavado com mais 50 mL de etanol para remover o restante. Os extratos foram deixados em maceração por dois dias em um béquer coberto com papel alumínio e protegidos da luz com agitação a cada dia. Depois foram filtrados em papel de filtro e o filtrado concentrado em evaporador rotatório a 60°C. O extrato etanólico bruto dos frutos maduros (EEBFM) rendeu 3,91 g (9,78%) e o extrato etanólico dos frutos verdes (EEBFV) rendeu 4,05 g (11,83%). Com os extratos foi realizada a marcha sistemática para extração e a obtenção da fração de alcalóides totais. Uma solução aquosa de HCl a 3% (50 mL) foi adicionada aos extratos, agitada em ampolas de separação e em seguida extraída com clorofórmio (3 x 100 ml) para extrair as graxas. Logo em seguida esta solução ácida foi basificada com NH₄OH até obter pH=9 e extraído com clorofórmio (3 x 100 mL). A fase clorofórmica foi adicionada de Na₂SO₄ com agitação para remover a possível água residual existente. Esta fase foi filtrada e evaporada em evaporador rotatório a 55°C resultando na fração de alcalóides totais (FAT) dos frutos maduros (290,18 mg, 0,73%) e frutos verdes (50,12 mg, 0,15%) (Esquema 3, pág. 133).

13.5 Avaliação dos marcadores nos frutos:

Para investigar a presença dos marcadores químicos nos frutos da Milona, foi injetado amostras na concentração de 1 mg/mL da FAT dos frutos maduros e da FAT dos frutos verdes em CLAE/DAD. Também foi injetado uma solução contendo os padrões a 100 µg/mL. Os espectros de UV dos possíveis picos cromatográficos dos marcadores na FAT dos frutos maduros e na FAT dos frutos verdes foram obtidos e comparados com os espectros de UV obtido dos padrões em solução através do índice de similaridade. Também foram feitos espectros de RMN de ¹H da FAT dos frutos maduros e FAT dos frutos verdes para observar os sinais característicos dos alcalóides nos frutos.

Esquema 3: Marcha sistemática para obtenção da FAT dos frutos maduros e FAT dos frutos verdes da *C. sympodialis*.



14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

14.1 Estudo da Sazonalidade

Os valores obtidos para a curva de calibração realizado no estudo da sazonalidade estão demonstrados na Tabela 23. Esses resultados foram plotados no gráfico da Figura 61 (pág. 135) as quantidades de milonina, warifteína e metilwarifteína encontradas no extrato após a regressão linear. As concentrações obtidas a partir da equação da reta foram de 8,34; 3,54 e 1,60 µg/mL, de milonina, warifteína e metilwarifteína, respectivamente. A Figura 62 (pág. 135) mostra os resíduos obtidos com os dados da curva de calibração. O intervalo de 95% de confiança para a milonina ficou entre 5,88 a 11,0 µg/mL, para a warifteína de 1,51 a 5,70 µg/mL e para a metilwarifteína 0,98 a 4,39 µg/mL. Os resultados obtidos com a equação da reta quando $y = 0$, foram de 8,34 µg/mL para a milonina, 3,54 µg/mL para a warifteína e 1,60 µg/mL para a metilwarifteína, portanto todos estão dentro do intervalo confiável.

Tabela 23: Área dos picos cromatográficos em relação à concentração no estudo da sazonalidade das folhas.

Amostra	Concentração ¹ (µg/mL)	Milonina Área do pico ²	Warifteína Área do pico ²	Metilwarifteína Área do pico ²
1	0	244776	268264	106162
2	2	283015	352699	169207
3	10	406989	700248	378541
4	20	641338	1169957	656450
5	30	880786	1698506	970311
6	50	1352419	2724480	1589793
7	100	2600254	5501498	3348574
Inclinação		23700 ± 465	52400 ± 905	32300 ± 738
Intercepto de Y quando X=0		198000 ± 20700	186000 ± 40300	51600 ± 32900
Intercepto de X quando Y=0		-8,34	-3,54	-1,60
Intervalo de confiança 95%				
Inclinação		22500 to 24900	50100 to 54800	30500 to 34200
Intercepto de X quando Y=0.0		-11.0 to -5.88	-5.70 to -1.51	-4.39 to 0.980
r ²		0,9981	0,9985	0,9974
F		2597	3355	1921
Valor P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

1: Amostras obtidas por adição de padrão a 1 mg/mL de milonina, warifteína e metilwarifteína.

2: Área obtida com a média de duas injeções de cada amostra.

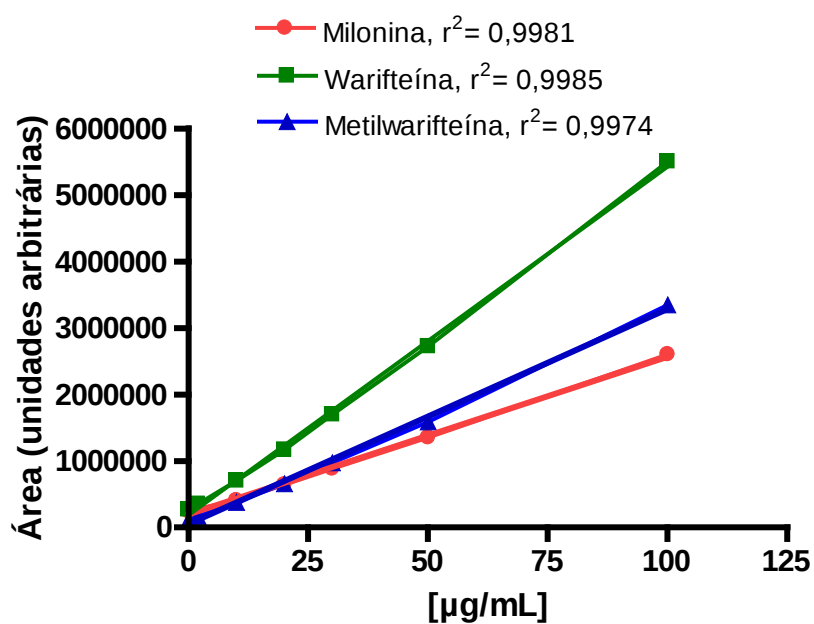


Figura 61: Curvas de calibração obtida no estudo da sazonalidade.

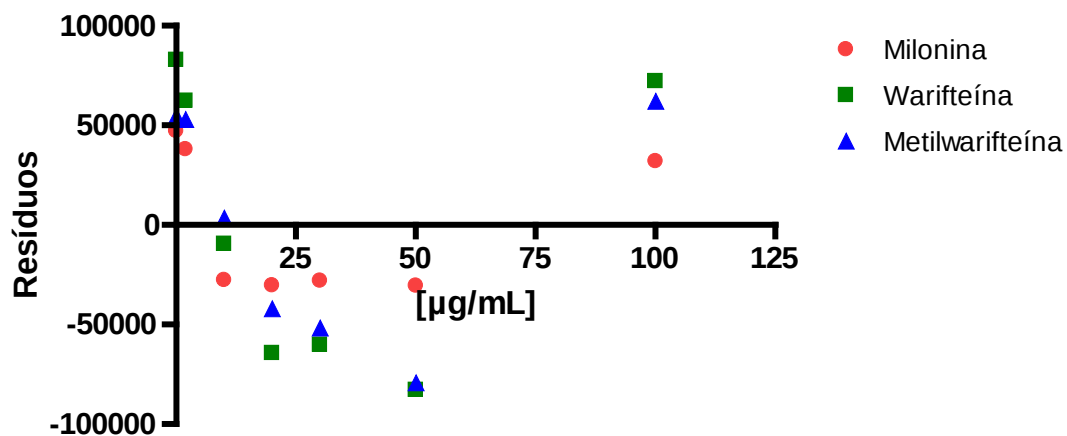


Figura 62: Gráfico de resíduos da curva de calibração obtida na sazonalidade.

A Figura 63 mostra um dos cromatogramas obtidos no estudo da sazonalidade sem adição dos marcadores obtidos em CLAE/DAD. Para a milonina o índice de similaridade variou de 0,96 no ápice do pico a 0,99 na base do pico. A pureza de pico na análise dos três pontos foi de 97,6% (Figura 64A, pág. 137). O índice de similaridade da warifteína variou de 0,9911 no ápice do pico a 0,9975 na sua base. A pureza do pico cromatográfico foi de 99,4% (Figura 64B, pág. 137), enquanto, para a metilwarifteína o índice de similaridade variou de 0,96 na base do pico a 0,99 no ápice do pico (Figura 64C, pág. 137). A pureza de pico registrado na análise foi de 97,9%.

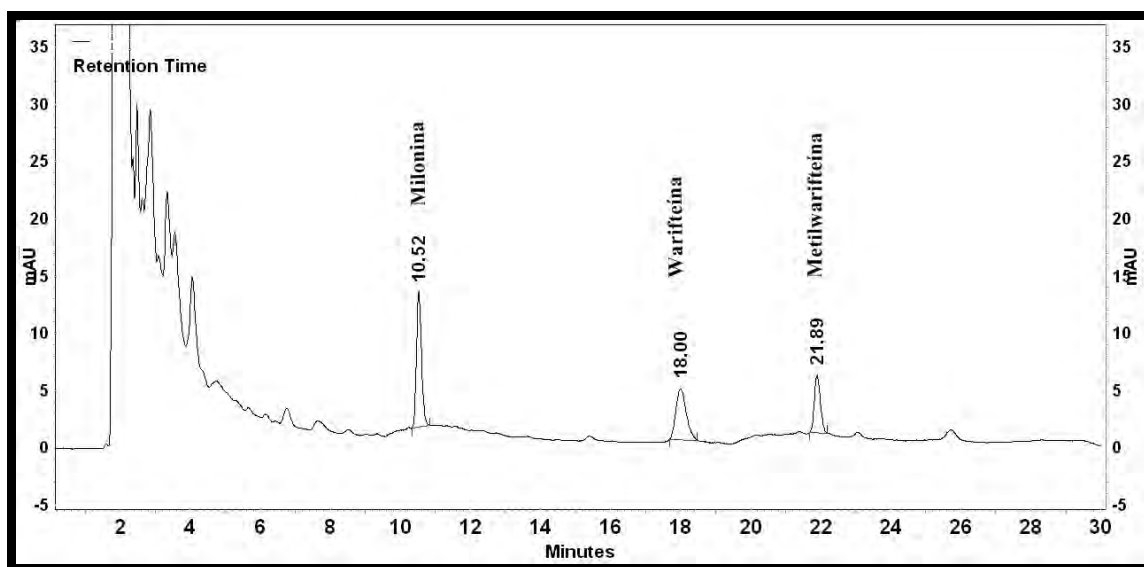


Figura 63: Cromatograma do extrato da sazonalidade sem adição dos marcadores do mês de dezembro obtido em CLAE/DAD.

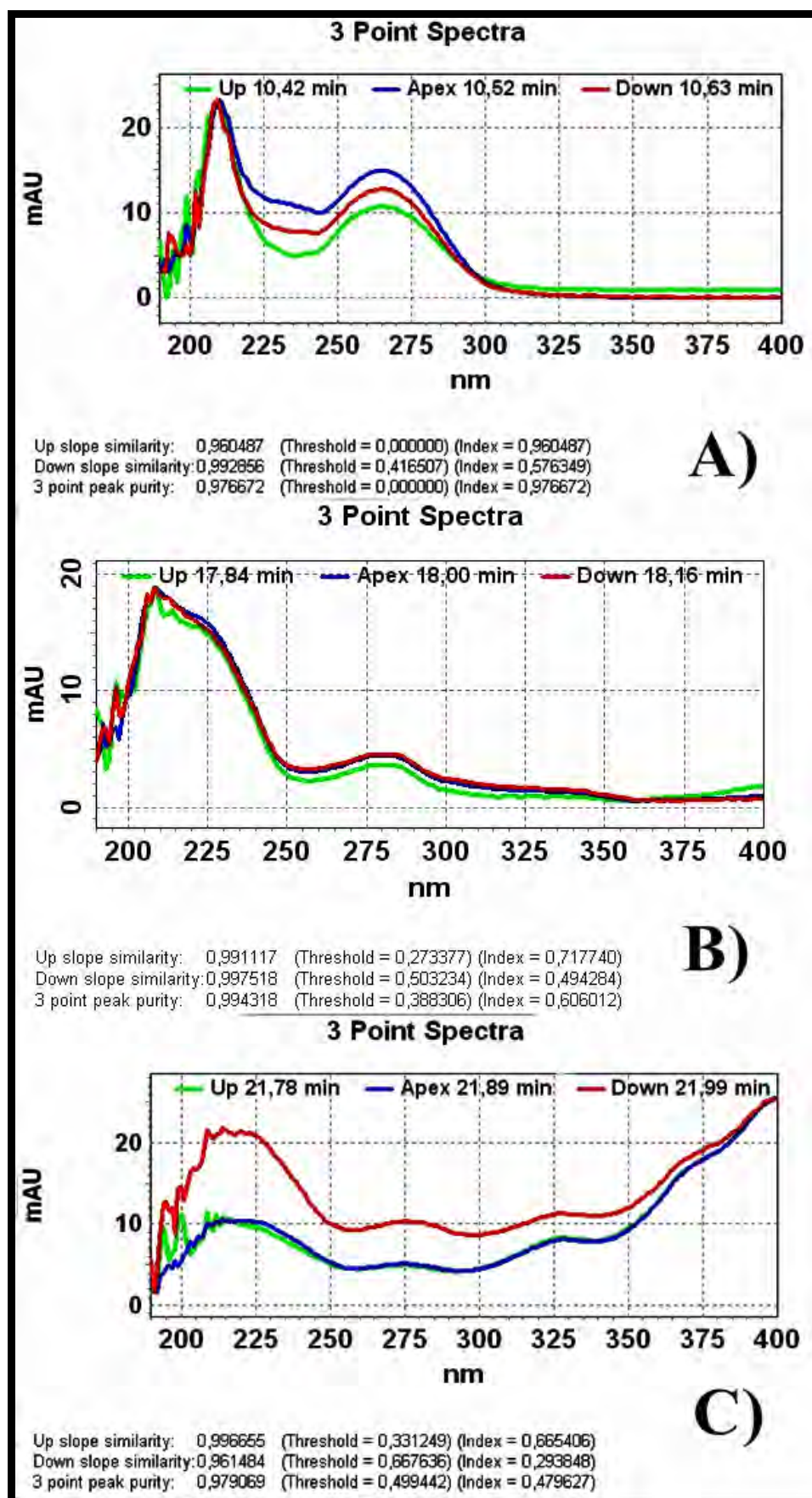


Figura 64: Perfil de pureza da milonina(A), warifteína(B) e metilwarifteína (C) no extrato das folhas sem adição dos marcadores no estudo da sazonalidade.

A Figura 65 mostra o cromatograma do extrato sem adição dos marcadores sobreposto com o extrato adicionado de 50 µg/mL dos marcadores obtido em CLAE/UV e Vis. A resolução do pico da metilwarifteína no extrato sem adição dos marcadores ficou em $R_s = 1,53$ (Figura 66, pág. 139), enquanto que no extrato com adição de 100 µg/mL dos marcadores ficou em $R_s = 1,72$ (Figura 67, pág. 139). Segundo Collins (2007) a resolução de $R_s = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos e para $R_s > 1,5$ indica separação completa, portanto os valores da resolução sugerem que o pico está bem resolvido.

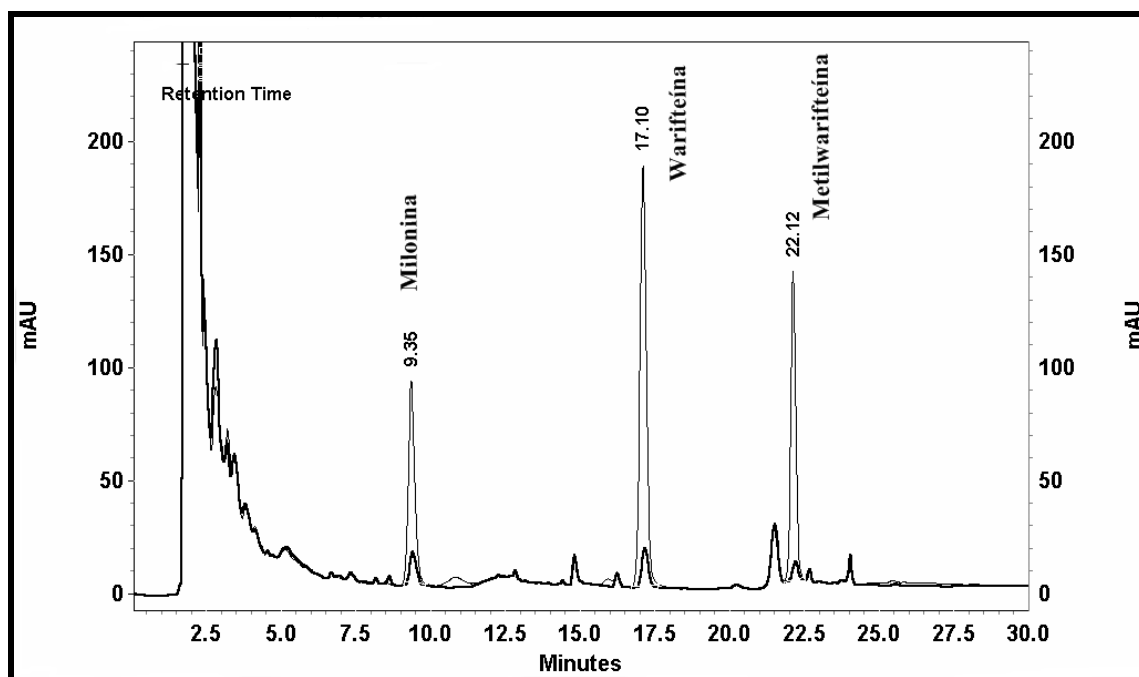


Figura 65: Cromatograma do extrato da sazonalidade com adição de 50 µg/mL dos marcadores.

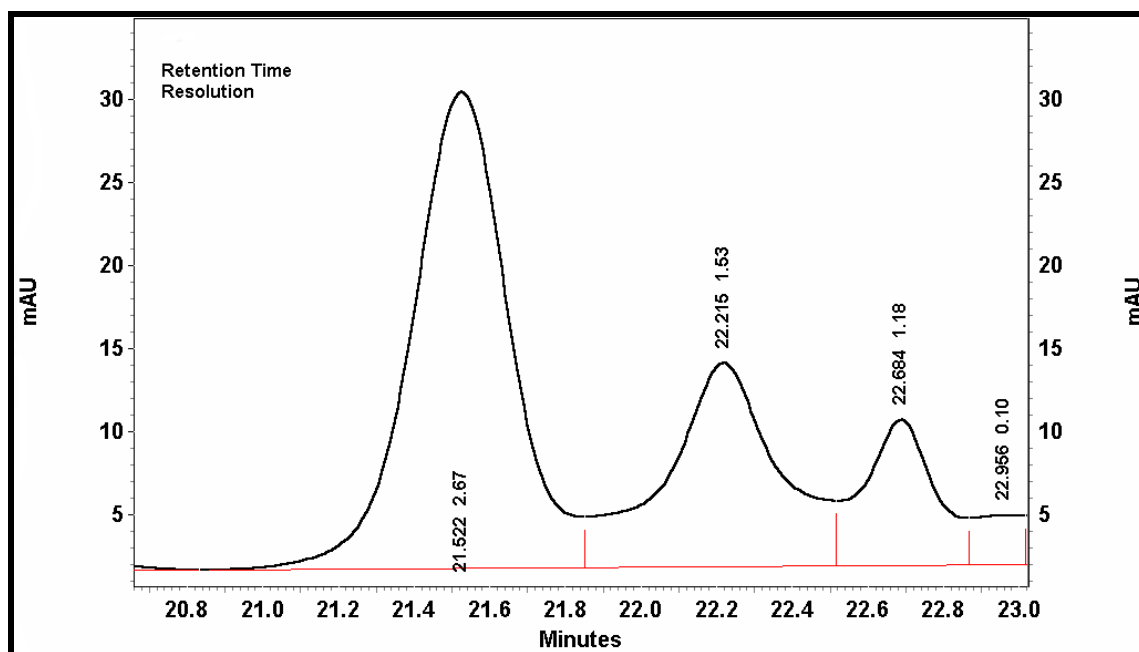


Figura 66: Cromatograma ampliado do extrato da sazonalidade sem adição dos marcadores.

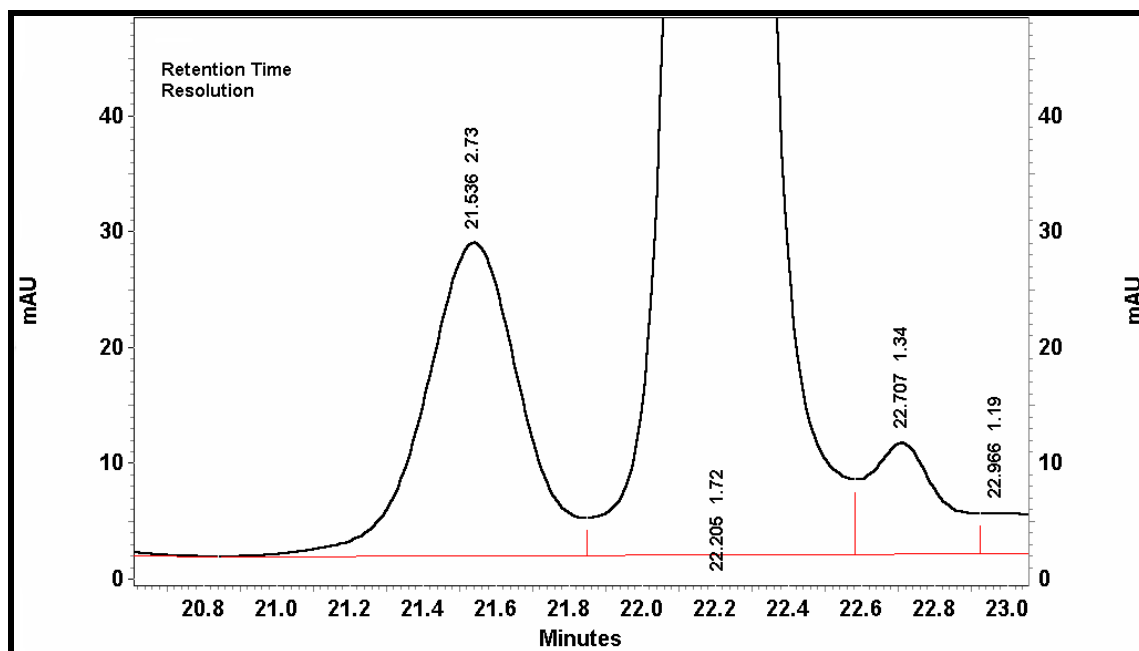


Figura 67: Cromatograma do extrato da sazonalidade com adição de 100 µg/mL dos marcadores e ampliado.

A Tabela 24 mostra as concentrações obtidas com as curvas de calibração de cada marcador na amostra analisada a partir de sua regressão linear.

Tabela 24: Concentrações obtidas a partir das curvas de calibração na sazonalidade.

Triplicatas	Milonina (µg/mL)	Warifteína (µg/mL)	Metilwarifteína (µg/mL)
Outubro			
1	10,34	5,08	3,36
2	10,32	5,16	3,21
3	8,89	4,64	3,13
Média	9,85	4,96	3,24
Dezembro			
1	7,90	4,43	3,07
2	6,83	4,85	2,60
3	7,55	4,20	2,70
Média	7,43	4,50	2,79
Fevereiro			
1	8,61	4,41	3,36
2	9,32	4,82	3,80
3	8,66	4,50	3,75
Média	8,86	4,58	3,63
Abril			
1	3,63	2,44	1,84
2	3,10	2,00	1,77
3	2,72	1,96	1,35
Média	3,15	2,13	1,66
Junho			
1	2,57	1,60	1,08
2	2,66	1,82	1,19
3	2,79	1,71	1,14
Média	2,67	1,71	1,14

A Tabela 25 mostra a quantidade de alcalóides totais de estudo (Milonina + Warifteína + Metilwarifteína) na concentração de mg.g^{-1} encontrados em cada mês de estudo da sazonalidade. A Figura 68 mostra a variação da quantidade dos marcadores durante todo o período de estudo da sazonalidade na concentração de $\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato. Foi observado que os níveis de alcalóides nas folhas foram diminuindo com o início do período de formação dos frutos da Milona, variando de $2,9 \pm 0,2 \text{ mg/g}$ ($n=3$) no mês de Outubro para $0,9 \pm 0,04 \text{ mg/g}$ ($n=3$) em junho, quando os frutos ficaram totalmente formados.

Tabela 25: Quantidade de alcalóides totais encontrados em cada mês de estudo da sazonalidade das folhas.

Mês	Milonina (mg/g, n=3)	Warifteína (mg/g, n=3)	Metilwarifteína (mg/g, n=3)	Alcalóides Totais (mg/g, n=3)
Outubro	$1,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,2$
Dezembro	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$
Fevereiro	$1,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
Abril	$0,5 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
Junho	$0,43 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,04$

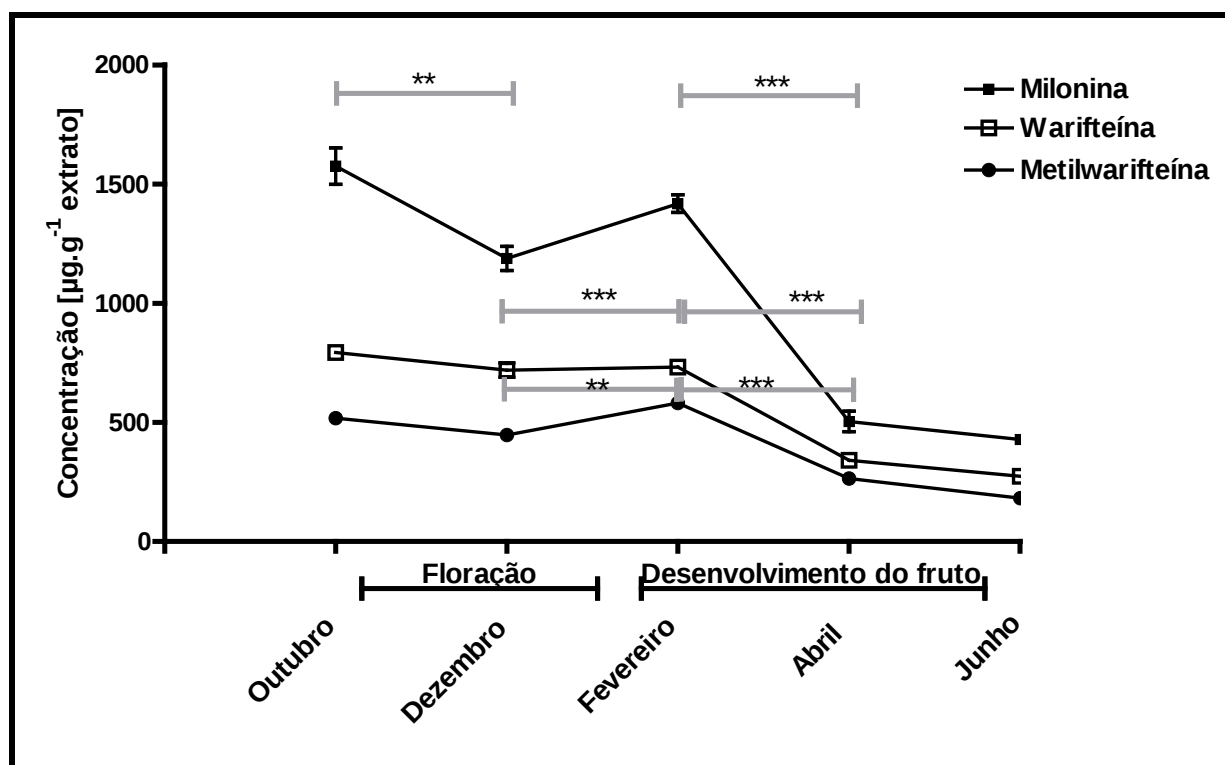


Figura 68: Variação da concentração dos marcadores no estudo da sazonalidade.

De acordo com a Figura 68 (pág. 141) houve diminuição significativa da concentração de milonina entre o mês de outubro e dezembro. Essa diminuição significativa também foi observada entre os meses de fevereiro e abril. Já para a warifteína e metilwarifteína não houve diferença significativa entre os meses de outubro e dezembro, mas se observou uma diminuição significativa entre os meses de fevereiro e abril. Essas diminuições proeminentes entre os meses de fevereiro e abril para as três moléculas coincidem com o período de frutificação da planta, e é verificado o aparecimento de warifteína e metilwarifteína nos frutos como esta demonstrada no cromatograma da FAT dos frutos maduros (Figura 70A, pág. 143) e na FAT dos frutos verdes (Figura 70B, pág. 143) comparados com o cromatograma dos padrões (Figura 69). Essa observação sugere a necessidade da biossíntese destes alcalóides pelos frutos.

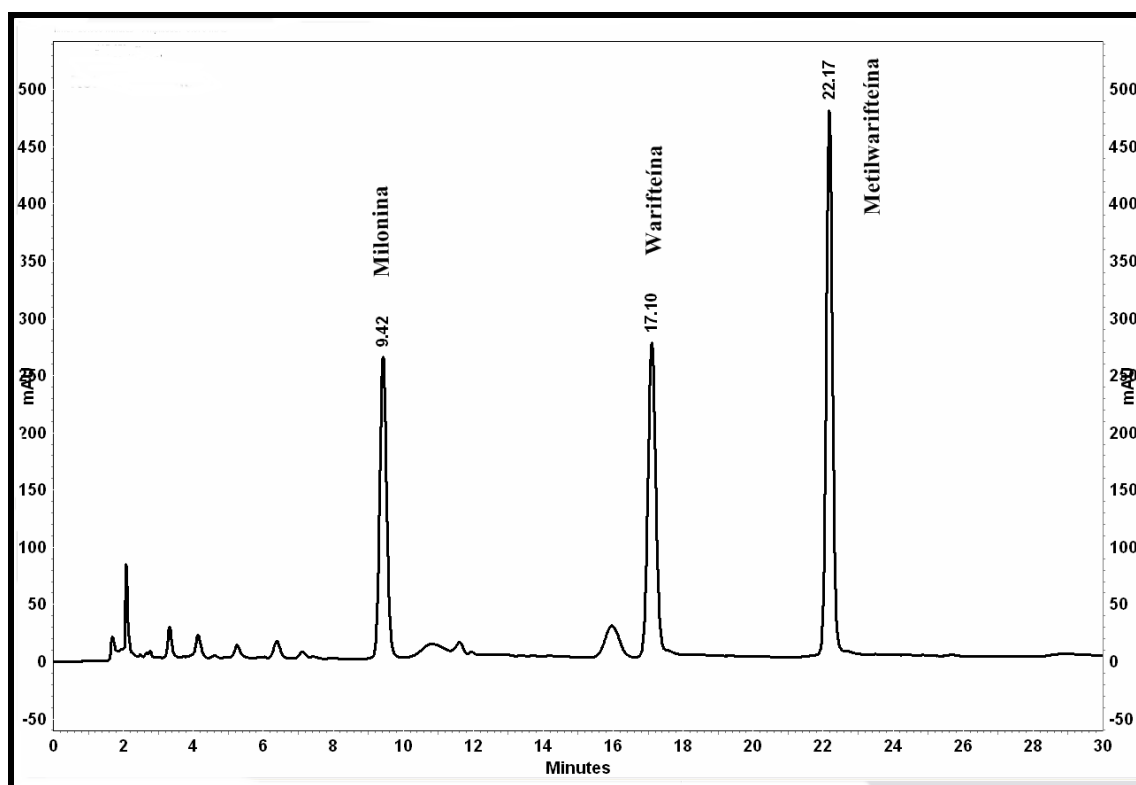


Figura 69: Cromatograma da injeção dos padrões a 100 $\mu\text{g/mL}$ no estudo da sazonalidade.

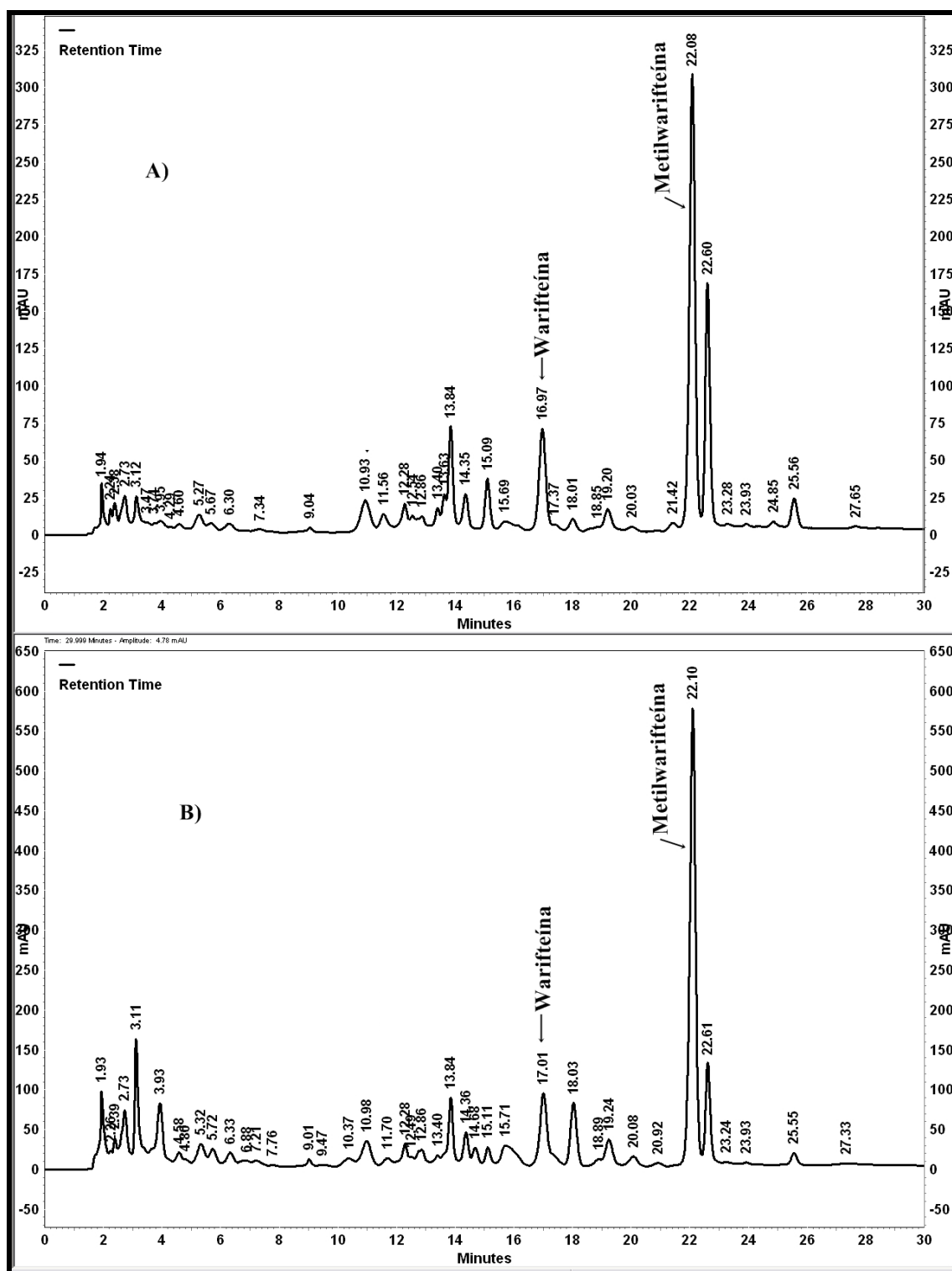


Figura 70: Cromatograma da FAT dos frutos maduros (A) e da FAT dos frutos verdes (B).

O índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos maduros analisado com os espectros de UV da solução padrão resultou no valor de 0,995 com a warifteína padrão confirmando a presença da warifteína nos frutos maduros (Figura 71).

Já o índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos maduros analisado com os padrões em solução foi de 0,994 tanto para a warifteína quanto para a metilwarifteína. Porém, o tempo de retenção também confirma a presença da metilwarifteína nos frutos maduros (Figura 72, pág. 145).

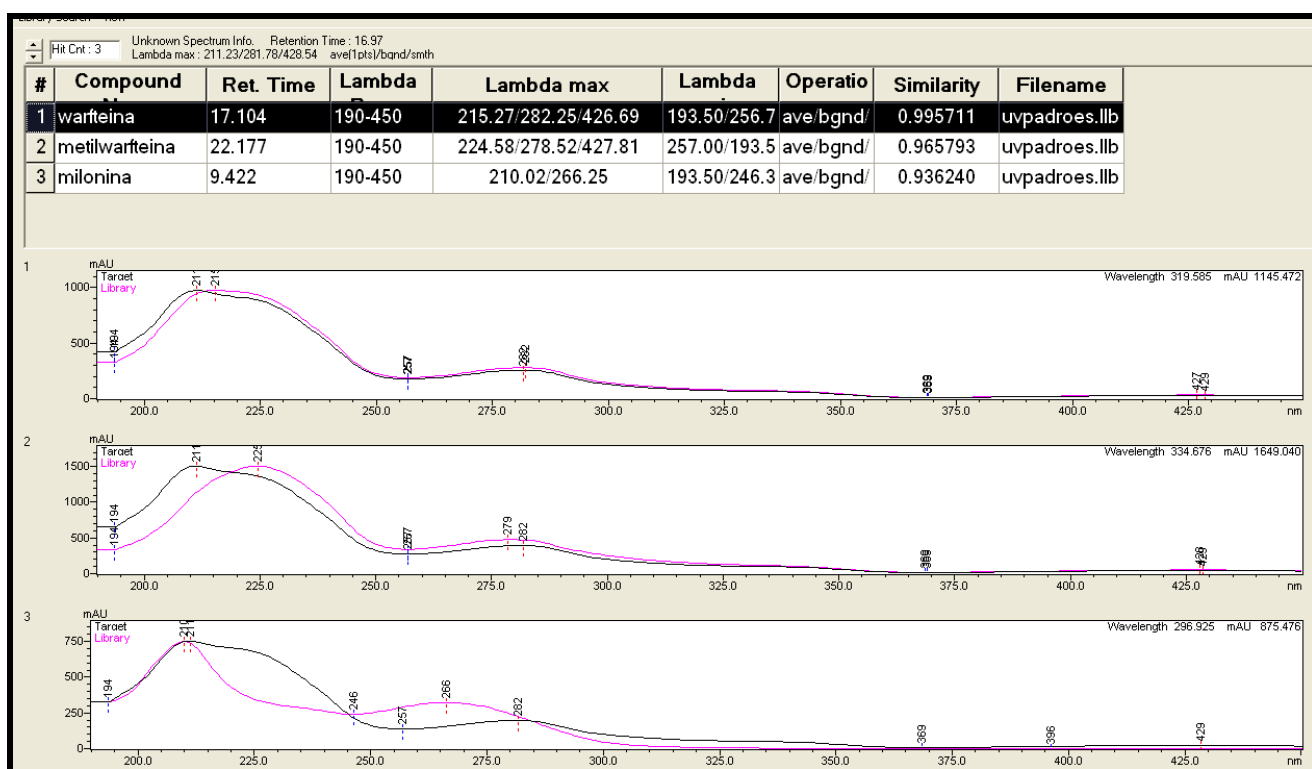


Figura 71: Índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos maduros com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.

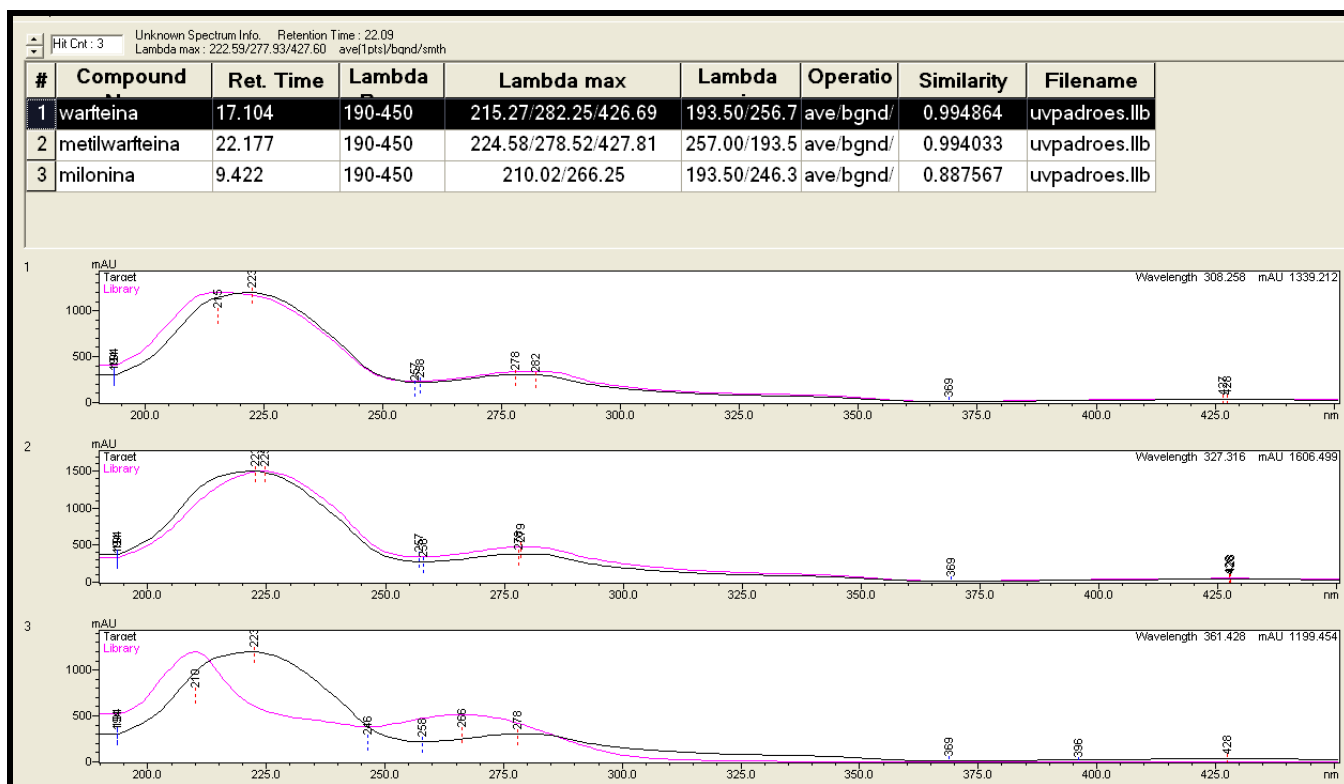


Figura 72: Índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos maduros com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.

O índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos verdes analisado com os espectros de UV da solução padrão resultou no valor de 0,911 em relação a warifteína padrão e juntamente com o tempo de retenção confirma o pico como sendo o da warifteína (Figura 73, pág. 146)

Já o índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos verdes analisado com os padrões em solução foi de 0,994 tanto para a warifteína quanto para a metilwarifteína. Porém, o tempo de retenção também confirma o pico como sendo o da metilwarifteína (Figura 74, pág. 146).

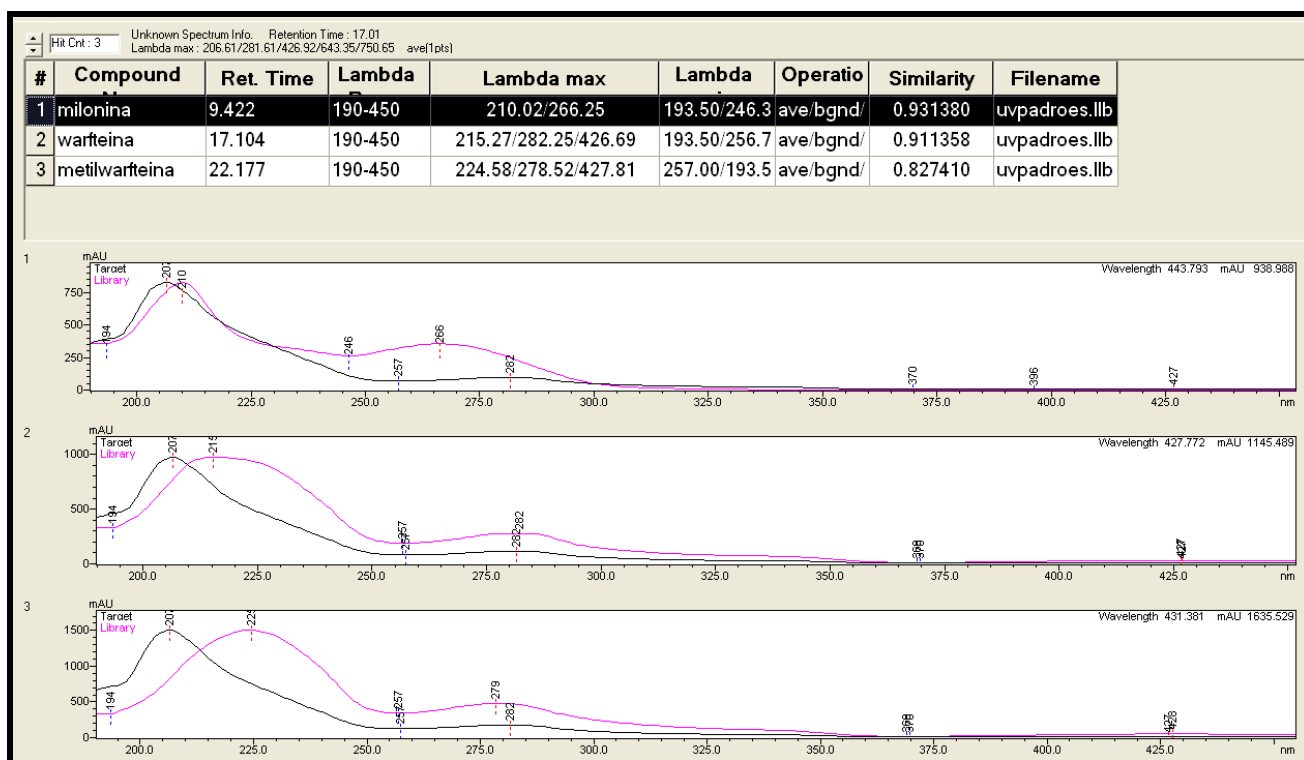


Figura 73: Índice de similaridade do espectro de UV da warifteína na FAT dos frutos verdes com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.

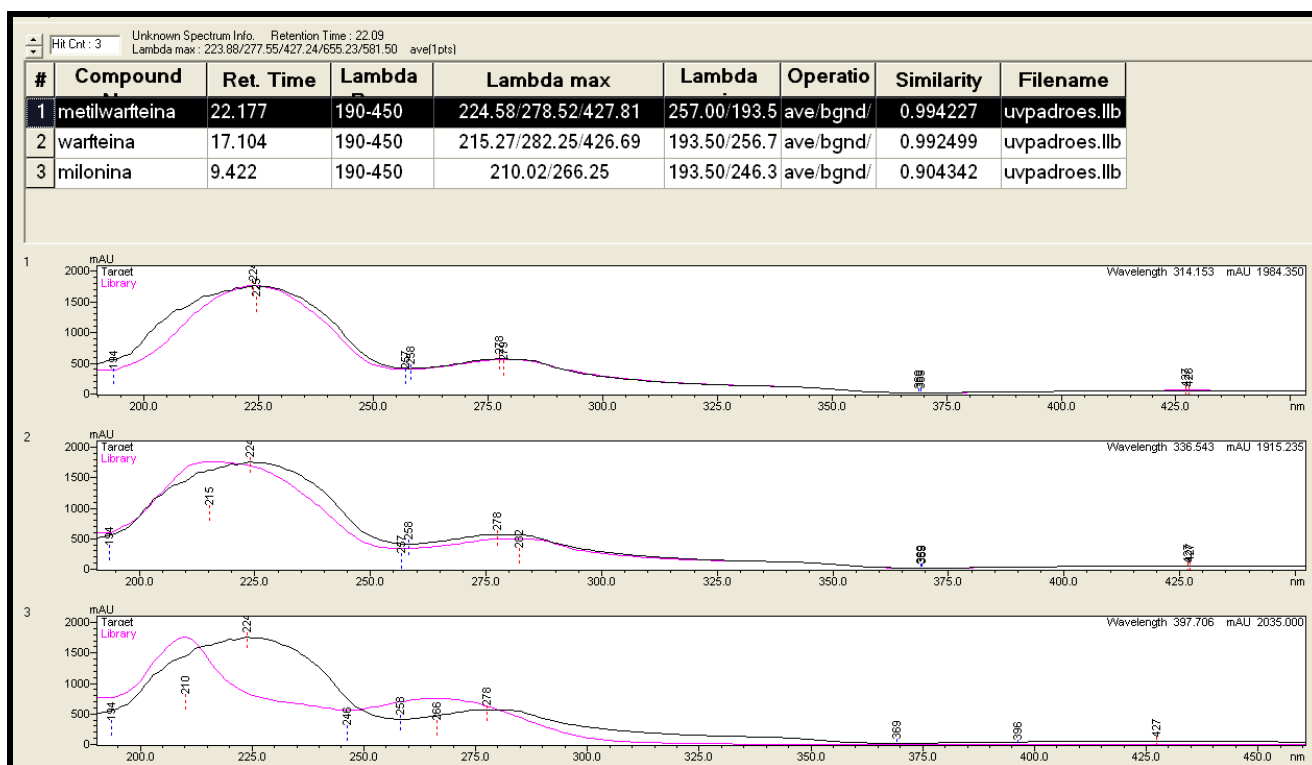


Figura 74: Índice de similaridade do espectro de UV da metilwarifteína na FAT dos frutos verdes com os espectros de UV dos padrões em solução a 100 µg/mL.

O espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros e dos frutos verdes estão demonstrados nas Figuras 75 e 78, respectivamente. A Figura 76 e 79 mostra a expansão do espectro da região de 1,8 a 4,0 ppm para os frutos maduros e para os verdes, respectivamente. Os singletos entre δ 1,96-2,58 ppm presente nos frutos maduros e nos verdes corresponde a um N-metil característico dos alcalóides. Os singletos que vão de δ 3,6 a 3,93 ppm são metoxilas que estão presentes nos alcalóides estudados. A região característica dos sistemas aromáticos está demonstrada na expansão dos espectros na Figura 77 para os frutos maduros e 80 para os frutos verdes.

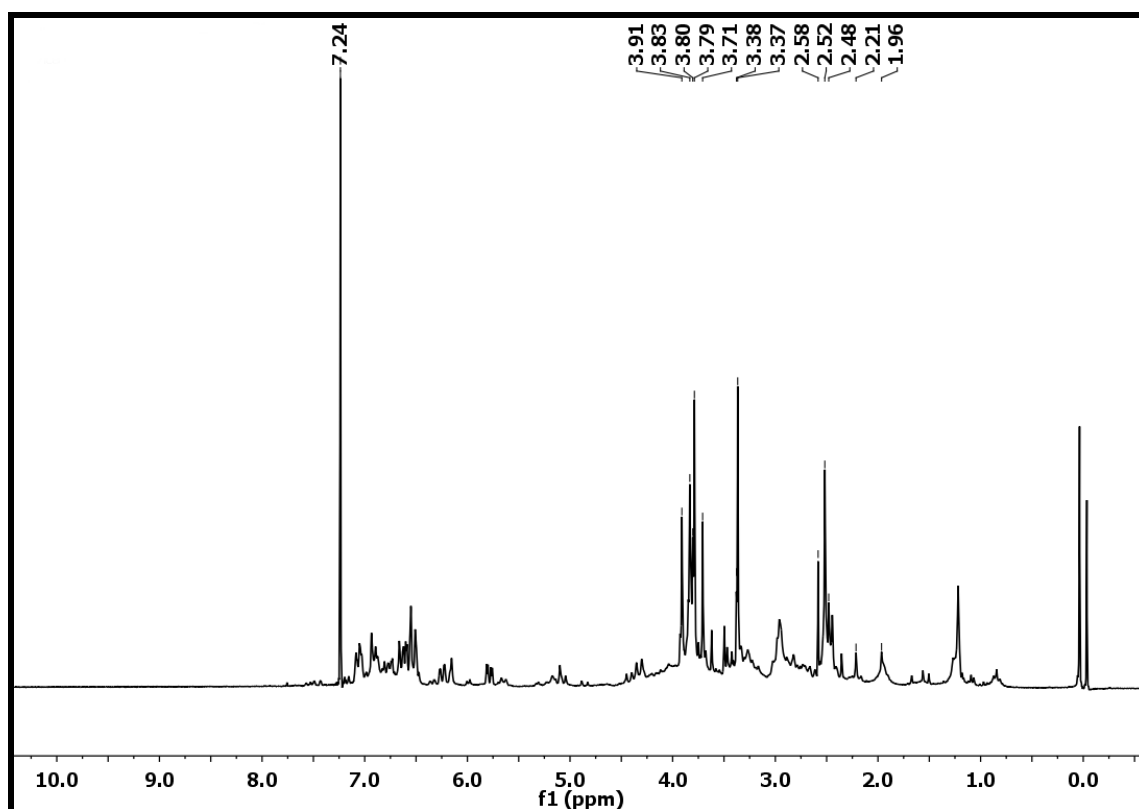


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H da fração da FAT dos frutos maduros da Milona (CDCl_3 , 200 MHz).

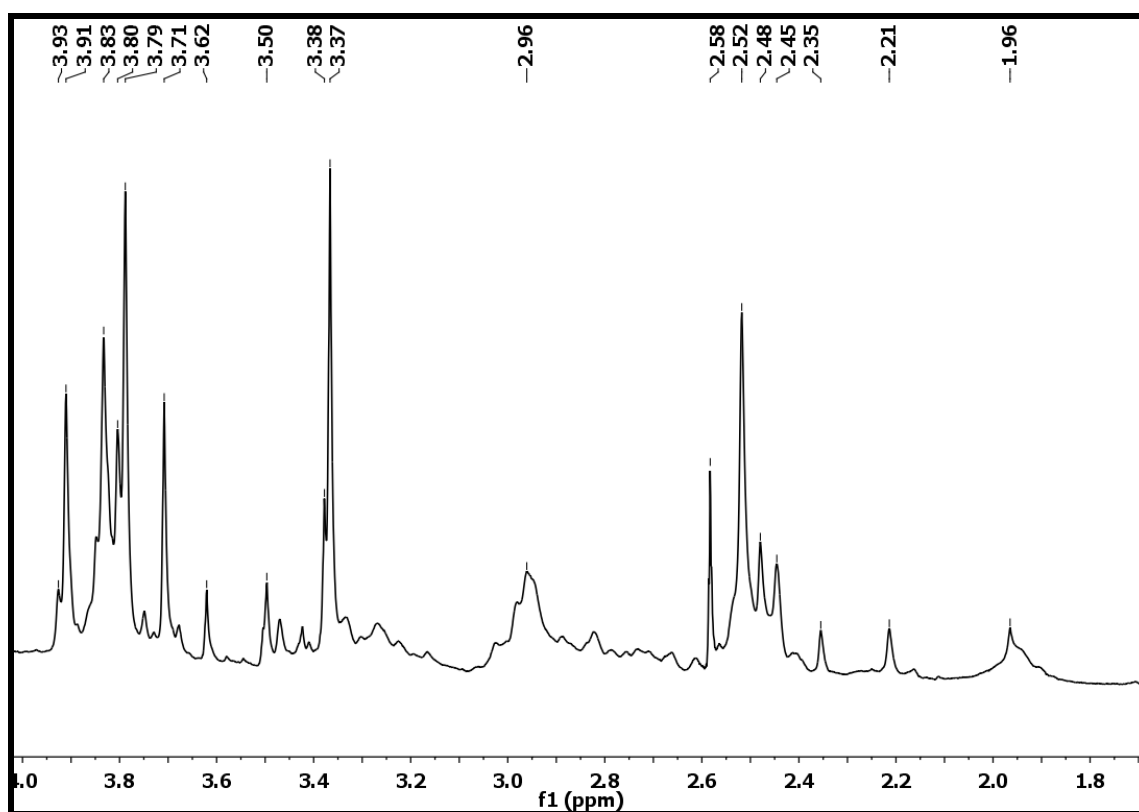


Figura 76: Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros da Milona da região de 1,8 a 4,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

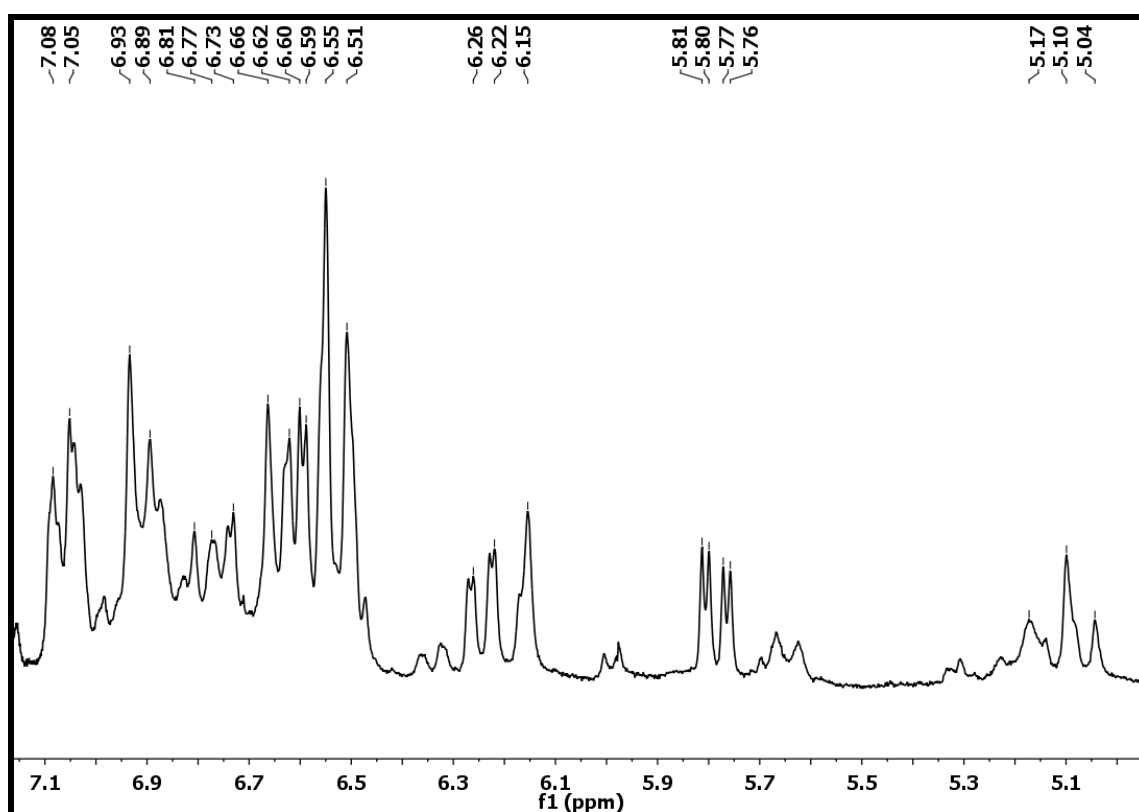


Figura 77: Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos maduros da Milona da região de 5,0 a 7,1 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

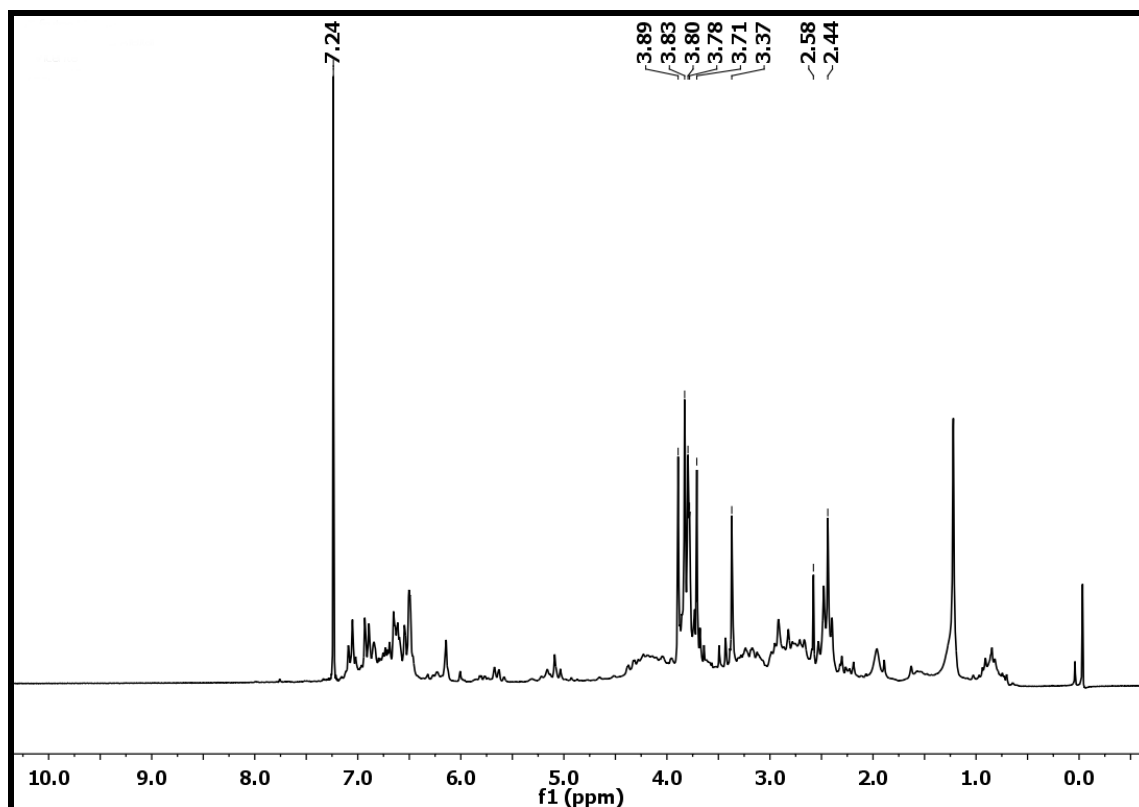


Figura 78: Espectro de RMN de ^1H da fração de alcalóides totais (FAT) dos frutos verdes da Milona (CDCl_3 , 200 MHz).

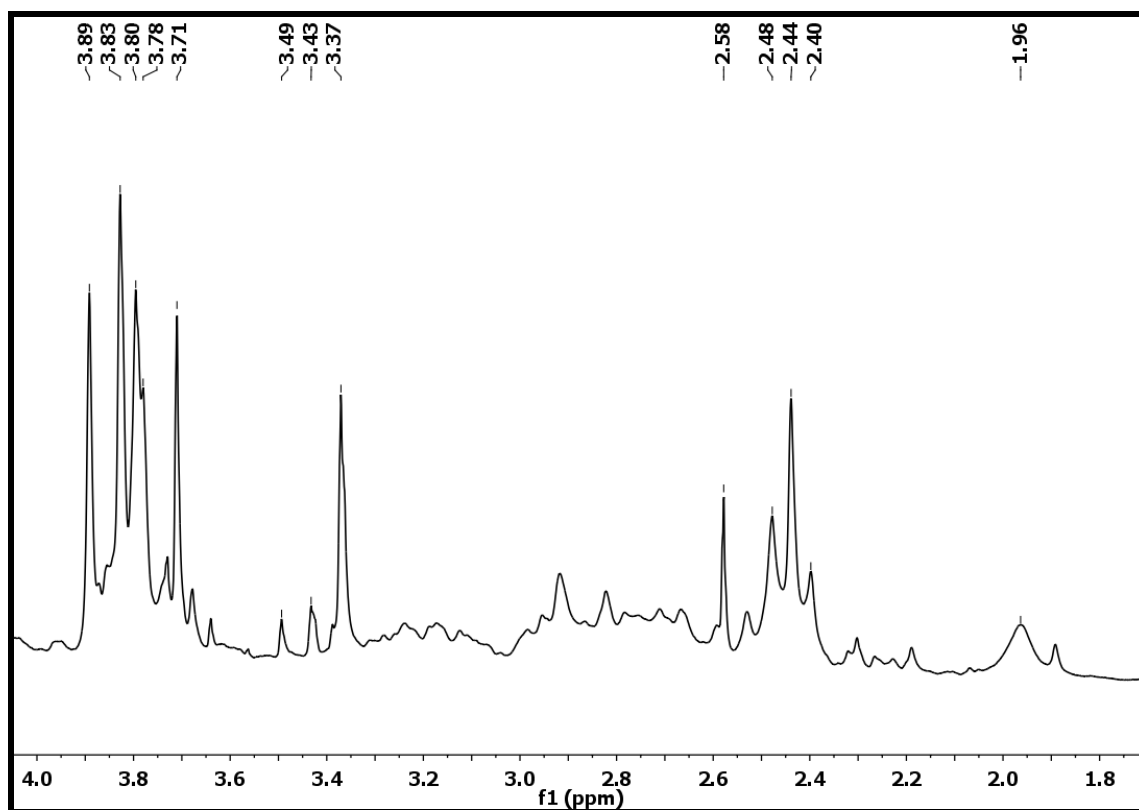


Figura 79: Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos verdes da Milona da região de 1,8 a 4,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).

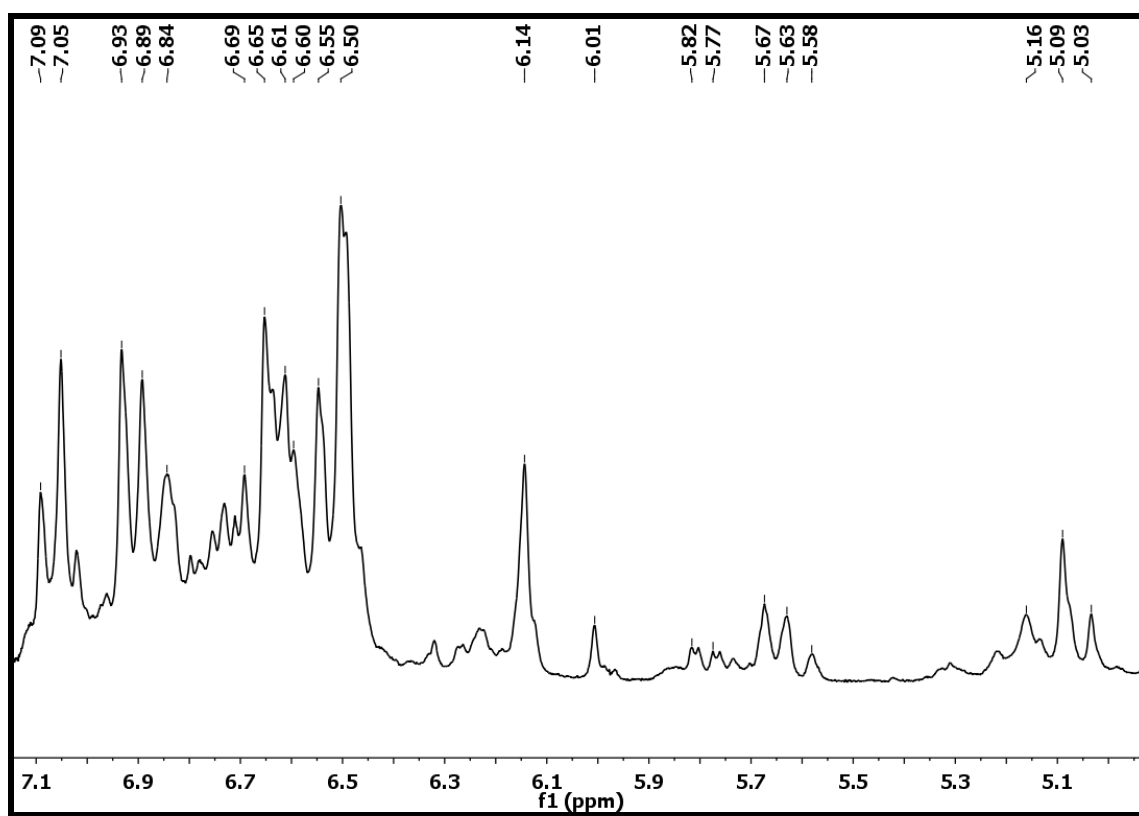
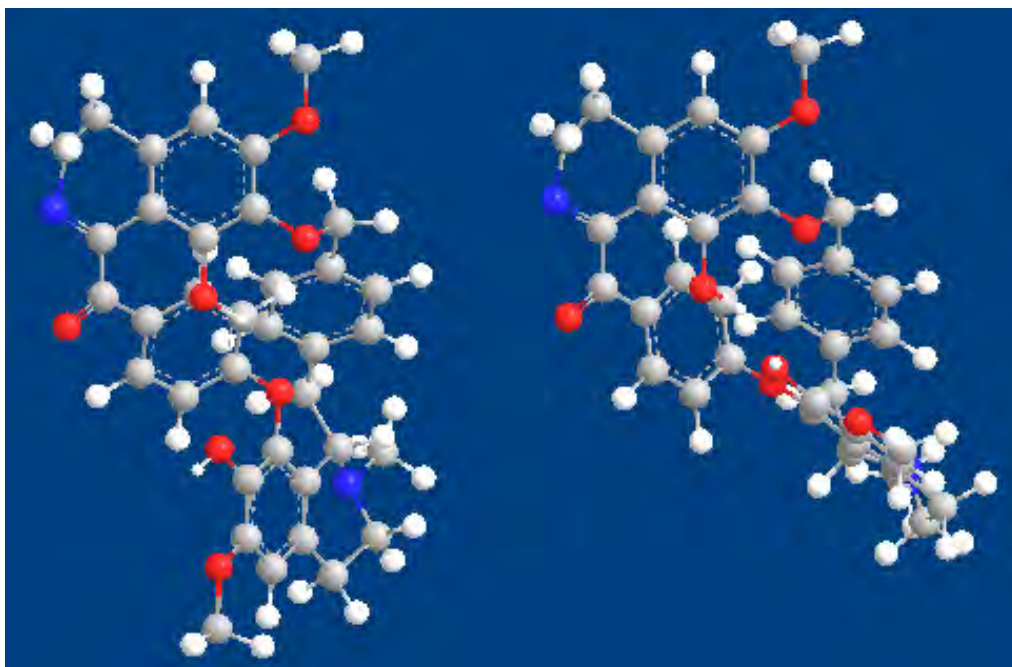


Figura 80: Expansão do espectro de RMN de ^1H da FAT dos frutos verdes da Milona da região de 5,0 a 7,1 ppm (CDCl_3 , 200 MHz).



Capítulo V

Elucidación estructural

15 Elucidação estrutural do composto CsR

O composto codificado como CsR foi isolada na forma de um pó amorfo, de coloração avermelhada. A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou um pico de um íon quasimolecular $[M+H]^+$ com m/z 607.2459 (valor calculado 607.2439), compatível com a fórmula molecular ($C_{36}H_{35}N_2O_7$) (Figura 82, pág. 159).

O espectro de infravermelho (IV) do composto CsR apresentou uma banda larga na região de 3.480 cm^{-1} , característico de estiramento OH de hidroxila fenólica. Outras absorções apareceram em 1.676 cm^{-1} característico de grupo carbonila α , β -insaturada, em 1.610 cm^{-1} de C=C olefínico e 1.503 cm^{-1} de C=C aromático (Figura 83, pág. 160).

O espectro de RMN de ^{13}C utilizando a técnica APT (Figura 88 a 92, pág. 165 a 169) mostrou a presença de 58 carbonos que se apresentaram em duplicidade, possivelmente uma mistura. Destes 58 sinais, 31 foram atribuídos para carbonos não hidrogenados (δ 109,15; 109,21; 122,78; 122,95; 123,61; 125,14; 128,64; 129,16; 131,85; 133,96; 134,25; 134,45; 134,82; 136,20; 137,47; 137,79; 138,14; 139,59; 143,27; 146,94; 147,77; 147,98; 148,08; 154,87; 155,24; 159,79; 160,47; 164,56; 164,68; 192,08; 192,45), 10 para carbonos metínicos (δ 60,87; 103,53; 108,40; 108,61; 113,45; 116,83; 128,02; 128,47; 128,88; 129,13), 11 carbonos metilênicos (δ 24,84; 24,91; 26,35; 26,53; 39,97; 43,22; 44,48; 46,45; 46,70; 75,27; 75,42), além de 6 carbonos metílicos (δ 41,00; 42,38; 56,01; 56,03; 56,14; 56,20) (Tabela 26, pág. 157) Estes dados comparados com o do alcalóide bisbenzilisoquinolínico warifteína (Tabela 27, pág. 158), isolada, anteriormente desta espécie, mostra certa similaridade entre os seus deslocamentos químicos, com exceção dos sinais em δ 192,08 ppm e 192,45 ppm característicos de carbonila que estão ausentes na warifteína.

Observou-se no espectro de RMN de ^1H (Figuras 84 a 87, pág. 161 a 164) a presença de um par de dubletos em δ 6,93 (2H, $J = 8,0\text{ Hz}$) e δ 7,00 (2H, $J = 8,0\text{ Hz}$) característicos de sistema AA'BB' de anel aromático sendo atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-11', H-13' e H-10', H-14', confirmado pela presença de pico de correlação entre os sinais no espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 93, pág. 170). Observação cuidadosa no espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 94, pág. 171) mostrou uma correlação entre δ 6,90 (d) com δ 7,18 (d) que permitiu sugerir-las para as posições H-13 e H-14 e outra correlação entre δ 6,55 (dl) com δ 7,85 (d) sugerindo as posições

H-11 e H-10, respectivamente. Outros pares de dubletos (Figura 95, pág. 172) em δ 4,98 (1H, $J = 12,0$ Hz) acoplado com δ 4,63 (1H, $J = 12,0$ Hz) e δ 4,99 (1H, $J = 12,5$ Hz) acoplado com δ 4,84 (1H, $J = 12,5$ Hz) característicos de hidrogênios metilênicos ligados a anel aromático, teve sua atribuição reforçada pela presença de correlação entre eles no espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 96, pág. 173). O espectro NOESY (Figura 97 a 99, pág. 174 a 176) mostra proximidade espacial entre δ 4,98 (d, 12,0); δ 4,99 (d, 12,5) e δ 4,63 (d, 12,0); δ 4,84 (d, 12,5) com o dubleto em δ 6,93 atribuído aos hidrogênios H-11' e H-13', dados que permitem atribuí-los para os hidrogênios 16'a e 16'b e que também reforçam a atribuição de H-11' e H-13'. Um dubleto em δ 2,70 foi atribuído aos hidrogênios na posição H-15', porque se correlaciona com o dubleto em δ 7,00 (2H, $J = 8,0$ Hz) correspondente aos hidrogênios nas posições H-10'/H-14' no espectro COSY, como também mostram sua proximidade espacial no espectro NOESY reforçando a atribuição destes para as posições H-10' e H-14'.

A presença de dois singletos em δ 2,32 (s, 3H) e δ 2,27 (s, 3H) (Figura 94, pág. 171) permitiu atribuir aos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio que são bem característicos desta região do espectro, reforçando a hipótese de uma mistura de dois alcalóides bisbenzilisoquinolínicos codificados como CsR-1a e CsR-1b. O multipletto em δ 3,10 (m) mostra uma proximidade espacial com os sinais em δ 2,70 (d), δ 2,32 (s), δ 2,27 (s), δ 3,32 (m), δ 2,96 (m) no espectro NOESY (Figura 97 a 99, pág. 174 a 176) o que permite atribuir ao hidrogênio H-1'. Os três singletos em δ 6,53 (s, 1H) e δ 6,43 (s, 1H)/6,40 (s, 1H) (sinais duplicados) foram atribuídos as posições 5' e 5 respectivamente. Observação cuidadosa da feição e integração do sinal em δ 6,53 (s) mostra um outro sinal duplicado, como ombro do anterior em δ 6,54 (s) sendo atribuído também ao hidrogênio 5' de um dos alcalóides. A justificativa para essas atribuições é que no espectro NOESY existe uma correlação entre os sinais em δ 6,43 (s) e δ 6,40 (s) com os sinais em δ 3,95 (s, 3H) e δ 3,96 (s, 3H) que estão sobrepostos, o que permite sugerir-los para a metoxila da posição 6. A outra correlação é entre os sinais em δ 6,53 (s) e δ 6,54 (s) com δ 3,83 (s, 3H) e 3,86 (s, 3H) atribuído a metoxila da posição 6'. A presença de 4 singletos característicos de metoxilas para as posições 6 e 6' de **CsR-1a** e **CsR-1b**, juntamente com a ausência de sinal característico de metoxila para a posição 7' quando comparado com a roraimina (Tabela 27, pág. 158), permite sugerir uma hidroxila nesta posição no lugar de uma metoxila. A análise do espectro de RMN de ^1H

e de ^{13}C permitiu sugerir um esqueleto de alcalóides do tipo bisbenziltetrahydroisoquinolínico unidos por duas ligações C7-CH₂-Ar e C12-C8'.

A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figuras 93-96, pág. 170-173) também sugere as atribuições para os hidrogênios 4a e 3a através dos picos de correlação entre os sinais δ 2,82 (H-4a) e δ 4,12 (ddd, 15,0; 5,5; 2,0; H-3a) e também as atribuições para os hidrogênios H-3b e H-4b através da correlação entre os picos δ 3,28 (m, H-3b) com δ 2,70 (H-4b). Além disso, outra correlação entre os picos δ 3,32 (m) e δ 2,75 permite confirmar o primeiro para H-3'a e inferir δ 2,75 para H-4'a. Também a existência de pico de correlação entre o sinal δ 2,96 (m) e δ 2,35 permite atribuí-los aos hidrogênios H-3'b e H-4'b. O restante dos sinais no espectro de RMN ^1H , ou seja, δ 7,85 (d) e δ 6,55 (dl), mostram as correlações no COSY e foram atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-11, respectivamente.

A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (Figura 100-103, pág. 177-180) permitiu confirmar as atribuições sugeridas para os hidrogênios e atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados, através das correlações ($\delta\text{H}/\delta\text{C}$) para a substância **1**: 4,12 e 3,28/46,45 (CH₂-3), 2,82 e 2,70/26,53 (CH₂-4), 3,32 e 2,96/44,48 (CH₂-3'), 2,75 e 2,35/24,84 (CH₂-4'), 2,70/39,97 (CH₂-15'), 4,98 e 4,63/75,42 (CH₂-16'), 6,43/103,53 (CH-5), 7,85/128,47 (CH-10), 6,55/113,45 (CH-11), 6,90/116,83 (CH-13), 7,18/129,13 (CH-14), 3,10/60,87 (CH-1'), 6,53/108,40 (CH-5'), 7,00/128,88 (CH-10'), 6,92/128,02 (CH-11'), 6,93/128,02 (CH-13'), 7,00/128,88 (CH-14'), 3,95/56,03 (MeO-6), 3,83/56,20 (MeO-6'), ausência de sinal em δ 61,9 o que infere em uma hidroxila no C-7', 2,32/42,38 (MeN-2') (Tabela 27, pág. 158).

A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 104-107, pág. 181-184) mostra correlação a três ligações dos sinais em δ 3,28 e 4,12 (H-3) com δ 164,68 o que permite atribuí-lo ao carbono 1. Outras correlações em δ 2,32 (MeN-2') e δ 2,96 (H-3'b) com δ 60,87 confirma a atribuição feita ao C-1'. O sinal em δ 6,43 (H-5) se correlaciona a três ligações com os sinais em δ 26,53, δ 109,21, δ 131,85 e a duas ligações com δ 155,24 o que confirma a atribuição feita ao carbono C-4 e sugere atribuição aos carbonos C-4b, C-7 e C-6, respectivamente. A correlação entre o sinal em δ 6,53 (H-5') a três ligações com os sinais em δ 24,84, δ 122,78, δ 138,14 e a duas ligações com δ 148,08 confirma atribuição feita ao carbono C-4' e sugere atribuição aos carbonos C-4'b, C-7' e C-6', respectivamente. O sinal em δ 7,00

(H10'/H14') correlaciona-se com o sinal em δ 39,97 confirmando atribuição ao carbono C-15'. A correlação dos sinais em δ 6,92 (H-11') e δ 6,93 (H-13') com o sinal em δ 75,42 confirma a atribuição feita para o carbono C-16'. O sinal em δ 3,10 (H-1') correlaciona-se com o sinal em δ 136,20 o que sugere atribuição ao carbono C-8'. A correlação entre o sinal em δ 3,83 (MeO-6') com o sinal em δ 148,08 sugere a atribuição ao carbono C-6', assim como a correlação entre o sinal em δ 3,95 (MeO-6) com o sinal em δ 155,24 permite sugerir a posição do carbono C-6. Os sinais em δ 6,92 (H-11') e δ 6,93 (H-13') se correlacionam com o sinal em δ 128,88 o que confirma os deslocamentos químicos feitos aos carbonos C-10' e C-14'. A correlação feita entre o sinal em δ 7,00 (H-10'/H-14') com os sinais em δ 128,02 e δ 134,82 confirma as atribuições feitas aos carbonos C-11' e C-13' e sugere o deslocamento químico do carbono C-12', respectivamente. Os sinais em δ 6,92 (H-11') e δ 6,93 (H-13') se correlacionam com o sinal em δ 139,59 o que sugere tratar-se do carbono C-9'. A correlação entre o sinal em δ 7,18 (H-14) com o sinal em δ 128,64 permite atribuí-lo ao carbono C-9. O sinal em δ 4,98 (H-16'a) se correlaciona com os sinais em δ 128,02, δ 131,85 e δ 134,82 o que confirma todas as atribuições feitas anteriormente aos carbonos C-11'/C-13', C-7 e C-12', respectivamente. A correlação entre o sinal em δ 4,63 (H-16'b) com os sinais em δ 128,02 e δ 131,85 confirma as atribuições anteriormente feita aos carbonos C-11'/C-13' e C-7. O sinal em δ 2,82 (H-4a) se correlaciona com o sinal em δ 46,45 o que confirma a atribuição ao carbono C-3. A confirmação da atribuição ao carbono C-3' foi observada pela correlação do sinal em δ 2,75 (4'a) com o sinal em δ 44,48. Outra correlação existente entre MeN-2' com C-1' foi confirmada pelo sinal em δ 2,70 ao se correlacionar com o sinal em δ 60,87. O sinal em δ 192,08 pode ser atribuído ao carbono carbonílico (C-15 ou C- α).

Para o composto **CsR-1b** a análise do espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C HMQC (Figura 100-103, pág. 177-180) permitiu confirmar as atribuições sugeridas para os hidrogênios e atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados, através das correlações ($\delta\text{H}/\delta\text{C}$): 6,40/103,53 (CH-5), 6,54/108,61 (CH-5'), 4,24 e 3,28/46,70 (CH₂-3), 2,80 e 2,70/26,35 (CH₂-4), 3,33 e 2,96/43,22 (CH₂-3'), 2,75/24,91 (CH₂-4'), 4,99 e 4,84/75,27 (CH₂-16'), 3,96/56,01 (MeO-6), 3,86/56,14 (MeO-6'), 2,27/41,00 (MeN-2'). O restante dos sinais foram os mesmos aos atribuídos a substância **1**.

A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 104-107, pág. 181-184) mostra correlação dos sinais em δ 3,28 e 4,24 (H-3) com δ 164,56 o que permite atribuí-lo ao carbono da posição 1. O sinal em δ 6,43 (H-5) se correlaciona com o sinal em δ 131,85 o que confirma a atribuição feita ao carbono C-7. A correlação entre o sinal em δ 6,54 (H-5') com os sinais em δ 122,95, δ 137,79 e δ 146,94 sugere atribuição aos carbonos C-4'b, C-7' e C-6', respectivamente. A correlação entre o sinal em δ 3,86 (MeO-6') com o sinal em δ 146,94 sugere a atribuição ao carbono C-6'. Os sinais em δ 6,92 (H-11') e δ 6,93 (H-13') se correlacionam com o sinal em δ 143,27 o que sugere tratar-se do carbono C-9'. A correlação entre o sinal em δ 2,70 (H-15') com o sinal em δ 143,27 confirma atribuição feita ao carbono C-9' anteriormente sugerido pela sua correlação com os hidrogênios H-11'/H-13'. O sinal em δ 4,99 (H-16'a) se correlaciona com os sinais em δ 128,47 e δ 133,96 o que confirma todas as atribuições feitas anteriormente aos carbonos C-11'/C-13' e C-12', respectivamente. A correlação entre o sinal em δ 4,84 (H-16'b) com os sinais em δ 128,47 e δ 131,85 confirma as atribuições anteriormente feita aos carbonos C-11'/C-13' e C-7. O sinal em δ 2,80 (H-4a) se correlaciona com o sinal em δ 46,70 o que confirma a atribuição ao carbono C-3. A confirmação da atribuição ao carbono C-3' foi observada pela correlação do sinal em δ 2,75 (H-4'a) com o sinal em δ 43,22. O sinal em δ 192,45 pode ser atribuído ao carbono carbonílico (C-15 ou C- α). O restante dos sinais foram os mesmos aos atribuídos a substância 1.

Os deslocamentos químicos do composto **CsR-1a** e **CsR-1b** são similares aos do alcalóide bisbenzilisquinolínico roraimina já anteriormente isolado desta mesma espécie (LIRA, 2002). No entanto, os sinais em δ 138,14 (C-7'), δ 136,20 (C-8') e δ 148,08 (C-6') diferem da mesma juntamente com a ausência do sinal em δ 61,9 (MeO-7') o que infere uma hidroxila no carbono C-7' e não o metoxi como em roraimina. Essa proposição é corroborada pela correlação no HMBC do sinal em δ 6,53 (H-5') com o sinal em δ 138,14 (C-7'). Os sinais em δ 41,38 e δ 41,00 foram atribuídos a dois N-metil de uma mistura de epímeros de alcalóides bisbenzilisquinolínicos. O sinal em δ 42,38 foi atribuído ao N-Me quando H-1' está na posição beta em um dos componentes da mistura e δ 41,00 quando H-1' está na posição alfa no outro componente. Essa diferença é explicada pelo efeito gama recíproco do N-Me com CH₂-15' nessa última situação.

A análise dos dados obtidos através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, permitem sugerir a estrutura do composto **CsR-1a** como sendo 7'-desmetilroraimina e do composto **CsR-1b** como sendo 1'-*epi*-7'-desmetilroraimina, dois alcalóides inéditos na literatura (Figura 81) e os seus deslocamentos químicos estão na Tabela 26 (pág. 157).

A Figura 108 (pág. 185) mostra o cromatograma obtido com a injeção de 50 $\mu\text{g/mL}$ da amostra que contém as substâncias propostas **CsR-1a** e **CsR-1b**, através dos picos cromatográficos que ficaram coeluinto. O índice de similaridade entre os espectros de UV do composto **CsR-1a** e do **CsR-1b** foi de 0,998. Essa semelhança pode ser observada com os espectros sobrepostos mostrados na Figura 108. As condições cromatográficas foram às mesmas utilizadas na “Validação do Método” Capítulo III.

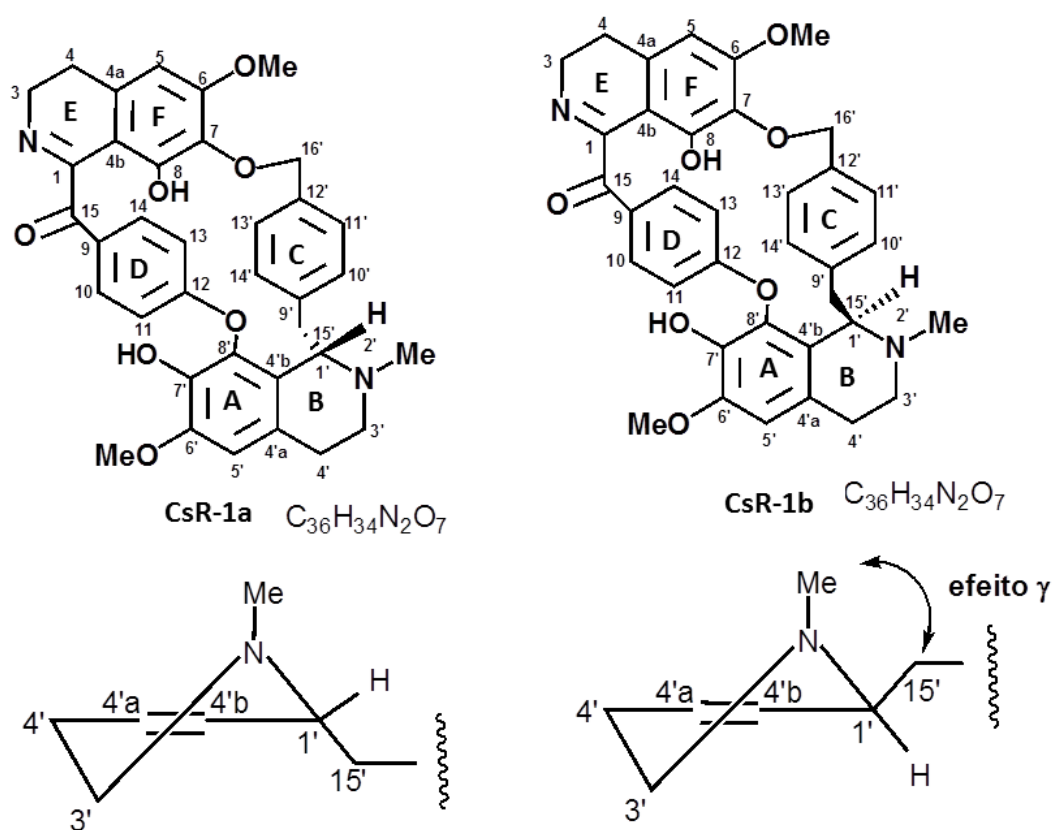


Figura 81: Proposta estrutural para os alcalóides 7'-desmetilroraimina (**CsR-1a**) e seu isômero 1'-*epi*-7'-desmetilroraimina (**CsR-1b**).

Tabela 26: Dados espectrais de RMN ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da 7'-desmetilroraimina (**CsR-1a**) e 1'-*epi*-7'-desmetilroraimina (**CsR-1b**) em CDCl_3 (J em Hz).

	CsR-1a				CsR-1b			
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C								
1	164,68	-		2H-3	164,56	-		2H-3
4a	134,45	-			134,25	-		
4b	109,21	-		H-5	109,15	-		
6	155,24	-	H-5	MeO-6	154,87	-		
7	131,85	-		H-5; 2H-16'	131,85	-		H-5; MeO-7
8	147,77	-			147,87	-		
9	128,64	-		H-14	129,16	-		
12	160,47	-			159,79	-		
15	192,08	-			192,45	-		
4'a	123,61	-			125,14	-		
4'b	122,78	-		H-5'	122,95	-		H-5'
6'	148,08	-	H-5'	MeO-6'	146,94	-	H-5'	MeO-6'
7'	138,14	-		H-5'	137,79	-		H-5'
8'	136,20	-			137,47	-		
9'	139,59	-		H-11'/H-13'	143,27	-	2H-15'	H-11'/H-13'
12'	134,82	-	H-16'a	H-10'/H-14'	133,96	-	H-16'B	
CH								
5	103,53	6,43 (s)			103,53	6,40 (s)		
10	128,47	7,85 (d)		H-14	131,47	7,86 (br s)		
11	113,45	6,55 (dl)			112,45	6,57 (br s)		
13	116,83	6,90 (d)			116,83	6,86 (br s)		
14	129,13	7,18 (d)			129,46	7,15 (br s)		
1'	60,87	3,10 (m)	H-15'a	MeN-2'; H-3'b	60,87	3,10 (m)		
5'	108,40	6,53 (s)			108,61	6,54 (s)		
10'	128,88	7,00 (d, 8,0)	H-11'					
11'	128,02	6,92 (d, 8,0)	H-10'	2H-16'	128,47			2H-16'
13'	128,02	6,93 (d, 8,0)	H-14'	2H-16'	128,47			2H-16'
14'	128,88	7,00 (d, 8,0)	H-13'					
CH₂								
3	46,45	4,12 (ddd, 15,0, 5,5, 2,0)	H-4a		46,70	4,24 3,28	H-4a	
4	26,53	2,82, 2,70		H-5	26,35	2,80, 2,70		
15	-	-	-	-	-	-	-	-
3'	44,48	3,32 (m), 2,96 (m)	H-4'a	MeN-2'	43,22	3,33 (m), 2,96(m)	H-4'a	MeN-2'
4'	24,84	2,75, 2,35		H-5'	24,91	2,75		
15'	39,97	2,70		H-10'/H-14'				
16'	75,42	4,98 (d, 12,0) 4,63 (d, 12,0)		H-11'/H-'13'	75,27	4,99 (d, 12,5) 4,84 (d, 12,5)		
CH₃								
MeO-6	56,03	3,95 (s)			56,01	3,96 (s)		
MeO-6'	56,20	3,83 (s)			56,14	3,86 (s)		
MeO-7'	-	-	-	-	-	-	-	-
MeN-2'	42,38	2,32 (s)			41,00	2,27 (s)		

Tabela 27: Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dos compostos **CsR-1a** e **CsR-1b** em CDCl_3 comparados com os valores descritos na literatura para **3** e **4**.

	CsR1a (66,9%) CDCl_3		CsR1b (33,1%) CDCl_3		3 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$		4 $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (9:1)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C								
1	164,68	-	164,58	-	166,7	-	166,2	-
4a	134,25	-	134,25	-	134,5	-	135,3	-
4b	109,21	-	109,15	-	111,19	-	109,0	-
6	155,24	-	154,87	-	155,9	-	153,6	-
7	131,51	-	131,85	-	133,6	-	130,1	-
8	148,02	-	147,87	-	150,8	-	148,8	-
9	129,46	-	129,16	-	127,1	-	130,9	-
12	160,47	-	159,79	-	160,8	-	154,2	-
15	192,08	-	192,45	-	193,4	-	-	-
4'a	134,45	-	125,14	-	131,0	-	124,6	-
4'b	123,61	-	122,95	-	124,2	-	124,1	-
6'	147,73	-	146,94	-	152,8	-	147,1	-
7'	138,14	-	137,79	-	153,2	-	138,0	-
8'	136,20	-	137,47	-	145,4	-	137,7	-
9'	139,59	-	143,27	-	143,3	-	142,1	-
12'	134,96	-	133,96	-	134,5	-	132,7	-
CH								
5	103,53	6,43 (s)	103,53	6,40 (s)	103,6	6,57 (s)	102,0	6,16 (s)
10	131,47	7,86 (br s)	131,47	7,86 (br s)	129,9	8,39 (dl, 8,4)	128,6	6,72 (br, d)
11	112,45	6,57 (br s)	112,45	6,57 (br s)	113,3	6,80 (dl, 8,4)	114,0	6,60 (d, 8,2)
13	116,83	6,86 (br s)	116,83	6,86 (br s)	117,9	7,36 (dl, 8,2)	114,0	6,60 (d, 8,2)
14	129,46	7,25 (br 15)	129,46	7,15 (br s)	132,4	7,80 (dl, 8,2)	128,6	6,72 (br, d)
1'	55,41	4,84 (br d, 8,5)	60,87	3,10 (m)	61,7	3,34	58,5	3,18
5'	108,40	6,53 (s)	108,61	6,54 (s)	110,7	6,77 (s)	107,8	6,45 (s)
10'	128,88	7,00 (d, 8,0)	128,47	7,20 (d, 8,0)	129,3	7,34 (d, 7,8)	128,3	7,01 (d, 7,7)
11'	128,02	6,92 (d, 8,0)	129,13	6,93 (d, 8,0)	129,8	6,90 (d, 7,8)	128,6	6,88 (d, 7,8)
13'	128,02	6,92 (d, 8,0)	129,13	6,93 (d, 8,0)	129,8	6,90 (d, 7,8)	128,6	6,88 (d, 7,8)
14'	128,88	7,00 (d, 8,0)	128,47	7,20 (d, 8,0)	129,3	7,34 (d, 7,8)	128,3	7,01 (d, 7,7)
CH₂								
3	46,45	4,24	46,70	4,12 (ddd, 15,0, 5,5, 2,0)3,28(m)	48,7	4,20 (m)	43,8	3,18 (td, 12,4, 4,5)
		3,28				3,50 (dt, 15,4, 5,3)		2,73 (m)
4	26,53	2,82, 2,70	26,35	2,69	27,2	2,66 (m)	23,3	2,45 (br, m)
15	-	-	-	-	-	-	45,3	4,01 (sl)
3'	44,48	3,32 (m), 2,96 (m)	43,22	3,33 (m), 2,96(m)	43,6	3,34 (m), 2,95 (m)	43,1	3,50 (sl)
4'	24,84	2,75, 2,35	24,91	2,75	22,1	3,01 (m), 2,40 (m)	23,3	2,89 (m), 2,45 (br, m)
15'	38,37	2,40	39,97	2,70	40,8	3,01 (m)	39,3	2,73 (m), 2,45 (br, m)
		2,36 9 (br d, 11,0)						
16'	75,42	4,98 (d, 12,0)	75,27	4,99 (d, 12,5)	75,0	5,35 (d, 12,3)	73,8	5,07 (br, m)
		4,63 (d, 12,0)		4,84 (d, 12,5)		5,04 (d, 12,3)		
CH₃								
MeO-6	56,03	3,95 (s)	56,01	3,96 (s)	56,3	3,94 (s)	55,5	3,88 (s)
MeO-6'	56,20	3,83 (s)	56,14	3,86 (s)	56,4	3,86 (s)	55,8	3,81 (s)
MeO-7'	-	-	-	-	61,9	3,88 (s)	-	-
MeN-2'	42,38	2,32 (s)	41,00	2,27 (s)	41,6	2,21 (s)	41,9	1,93 (s)

[3] *Fitoterapia* **2002**, 73, 356. Substância denominada roraimine.

[4] *Magn. Reson. Chem.* **2003**, 41, 213. Substância denominada warifteine. Os δ_{C} foram registrados em CDCl_3 - CD_3OD_3 .

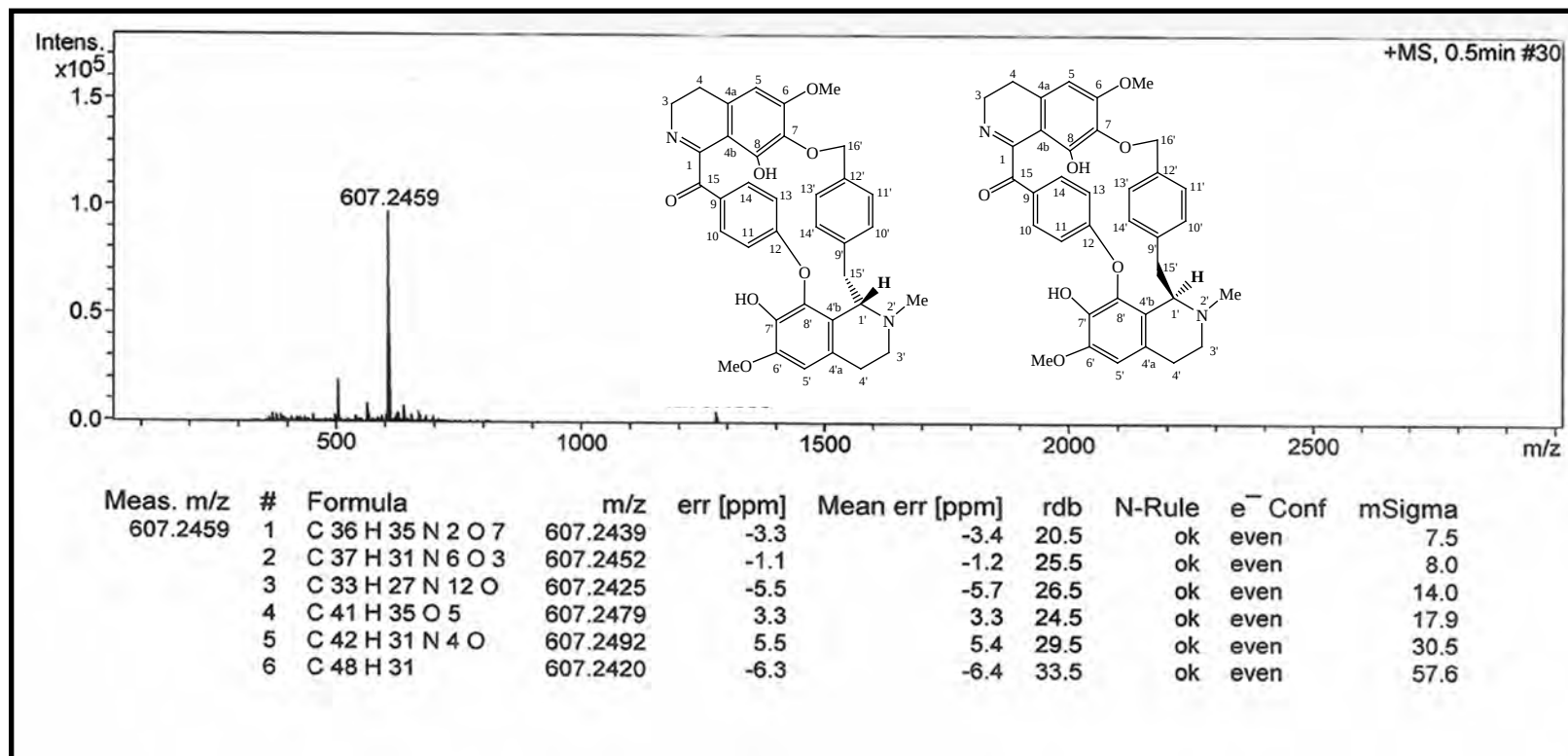


Figura 82: Espectro de massas de alta resolução da substância CsR

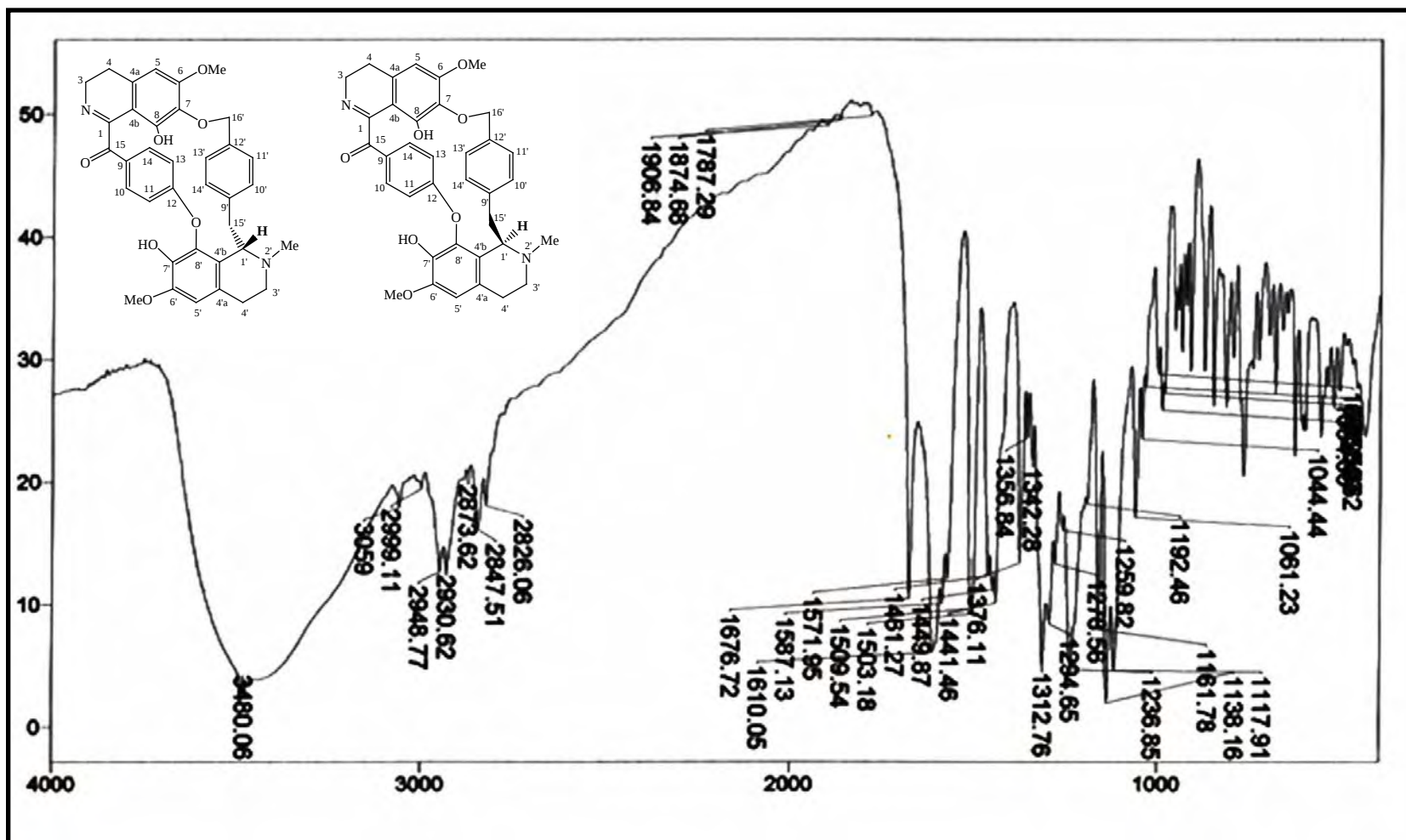
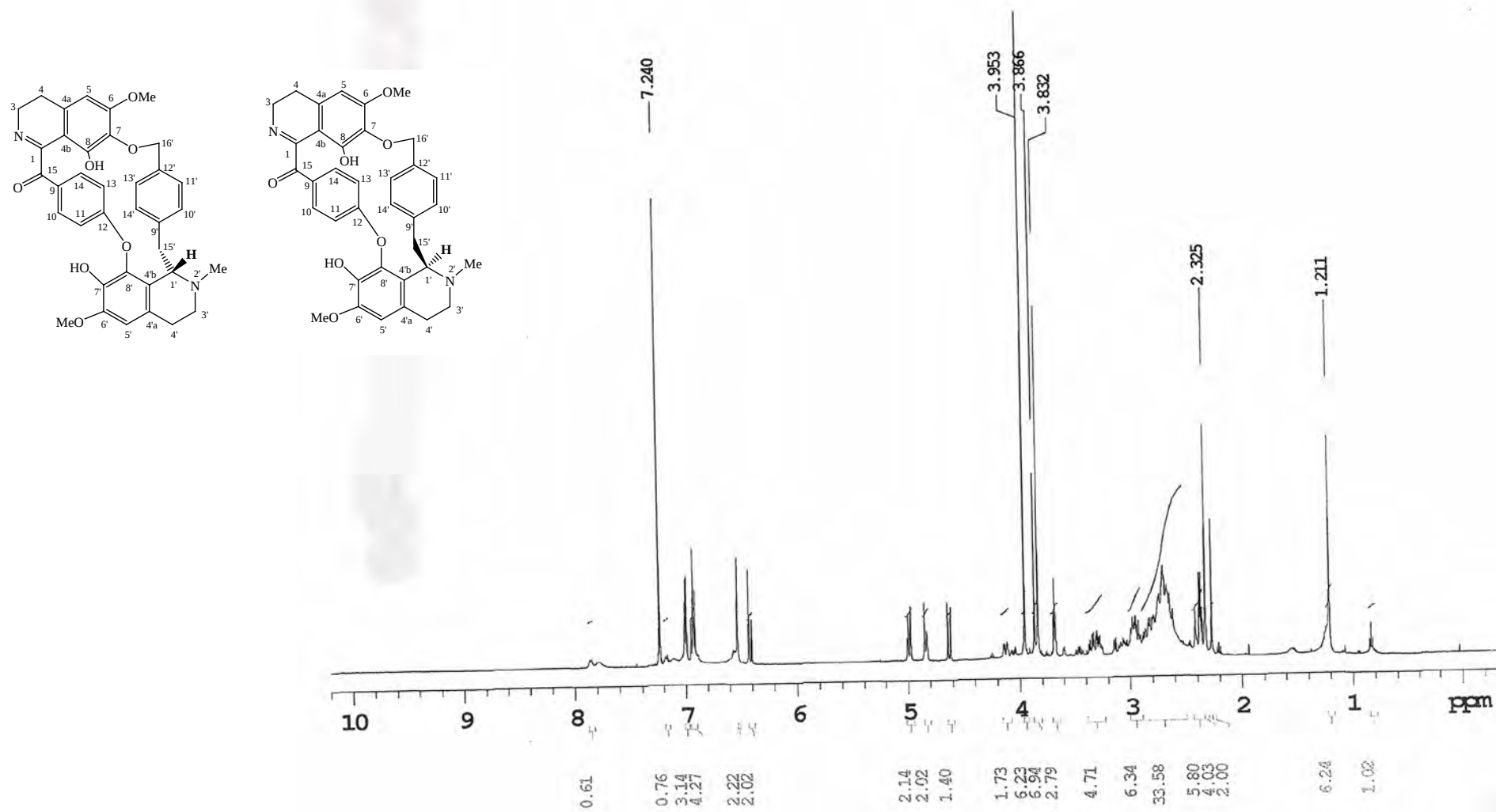


Figura 83: Espectro de IV de CsR em KBr

Figura 84: Espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500 MHz)

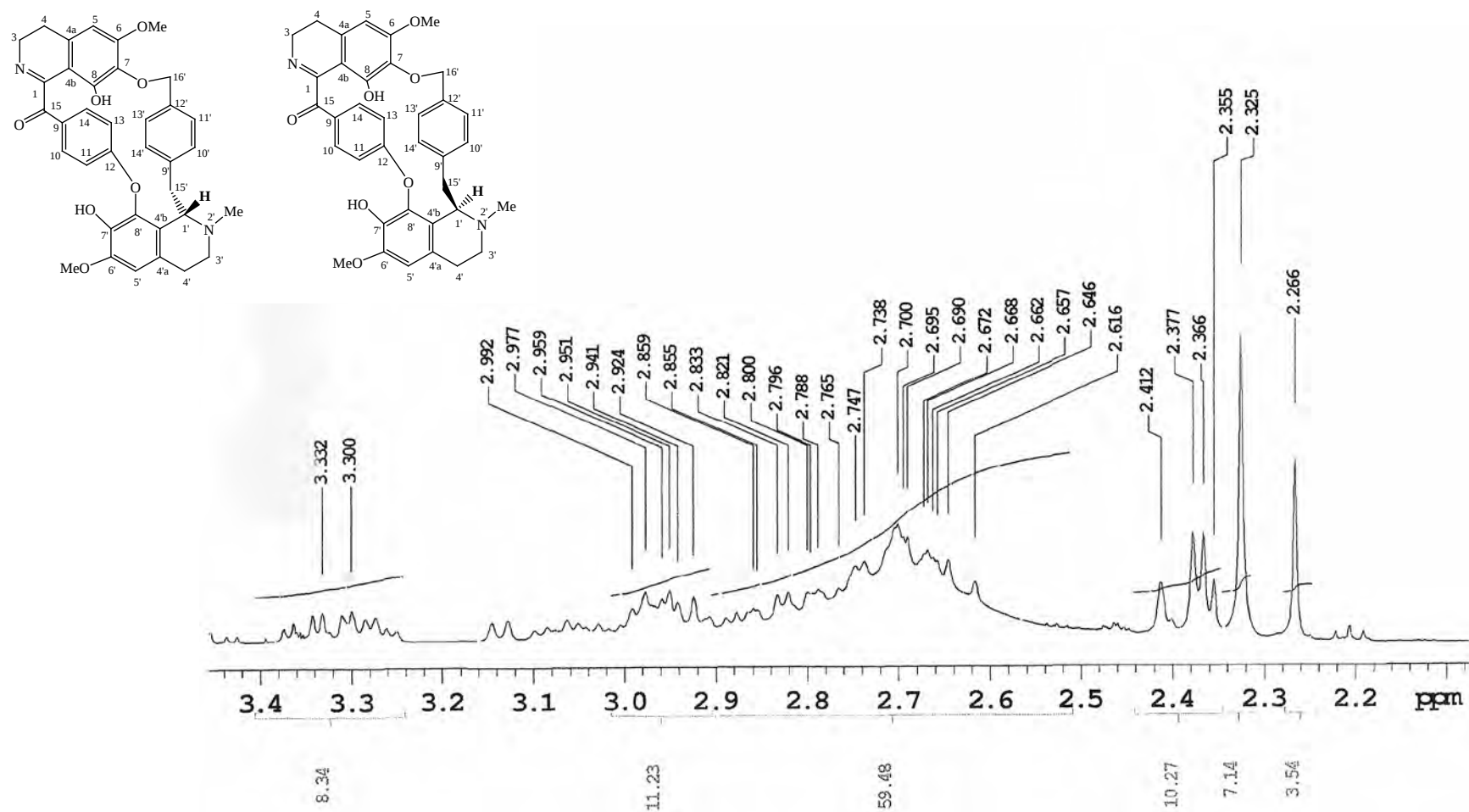


Figura 85: Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500MHz) – região de 2,1 a 3,45 ppm

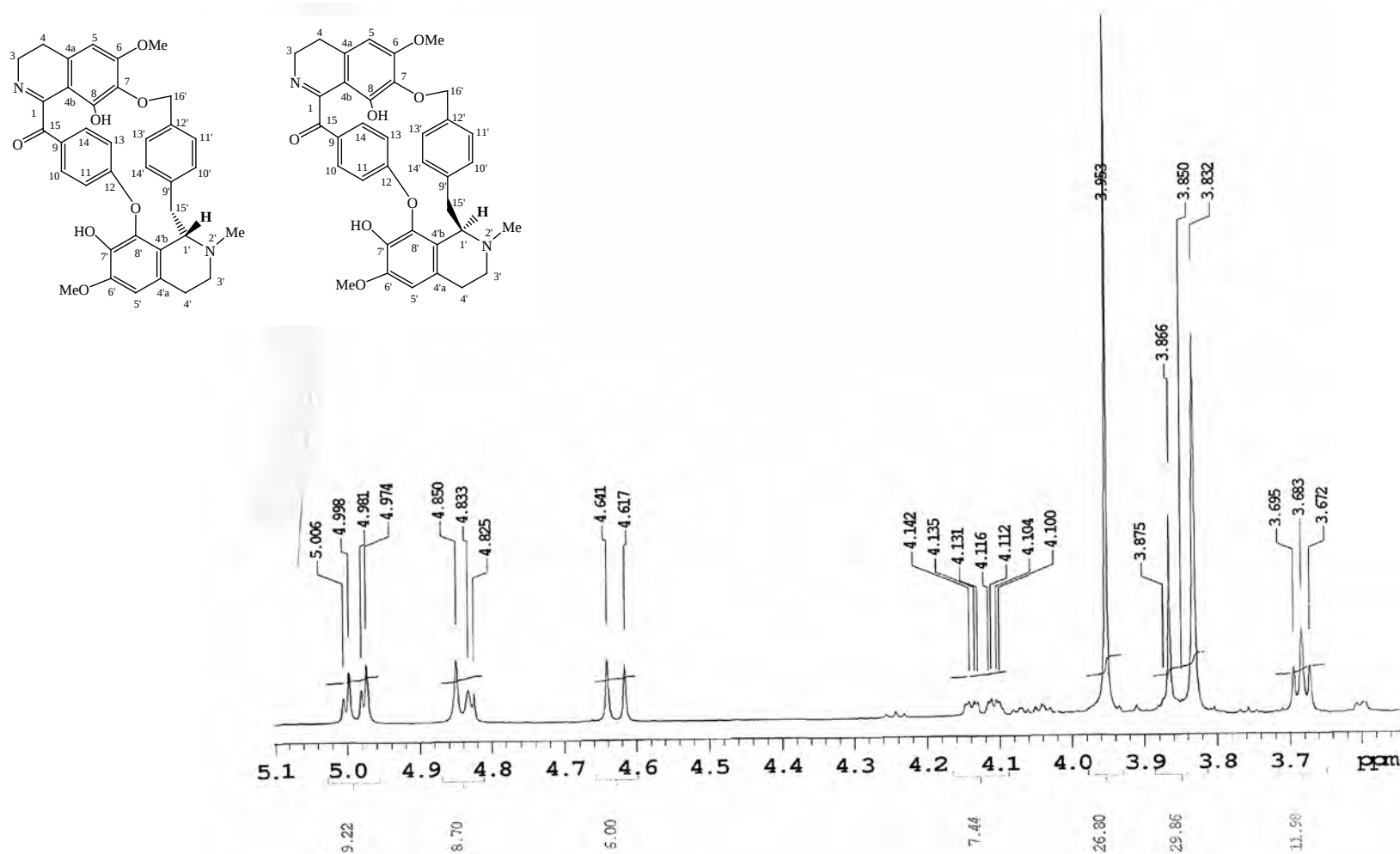


Figura 86: Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl₃, 500MHz) – região de 3,6 a 5,1 ppm

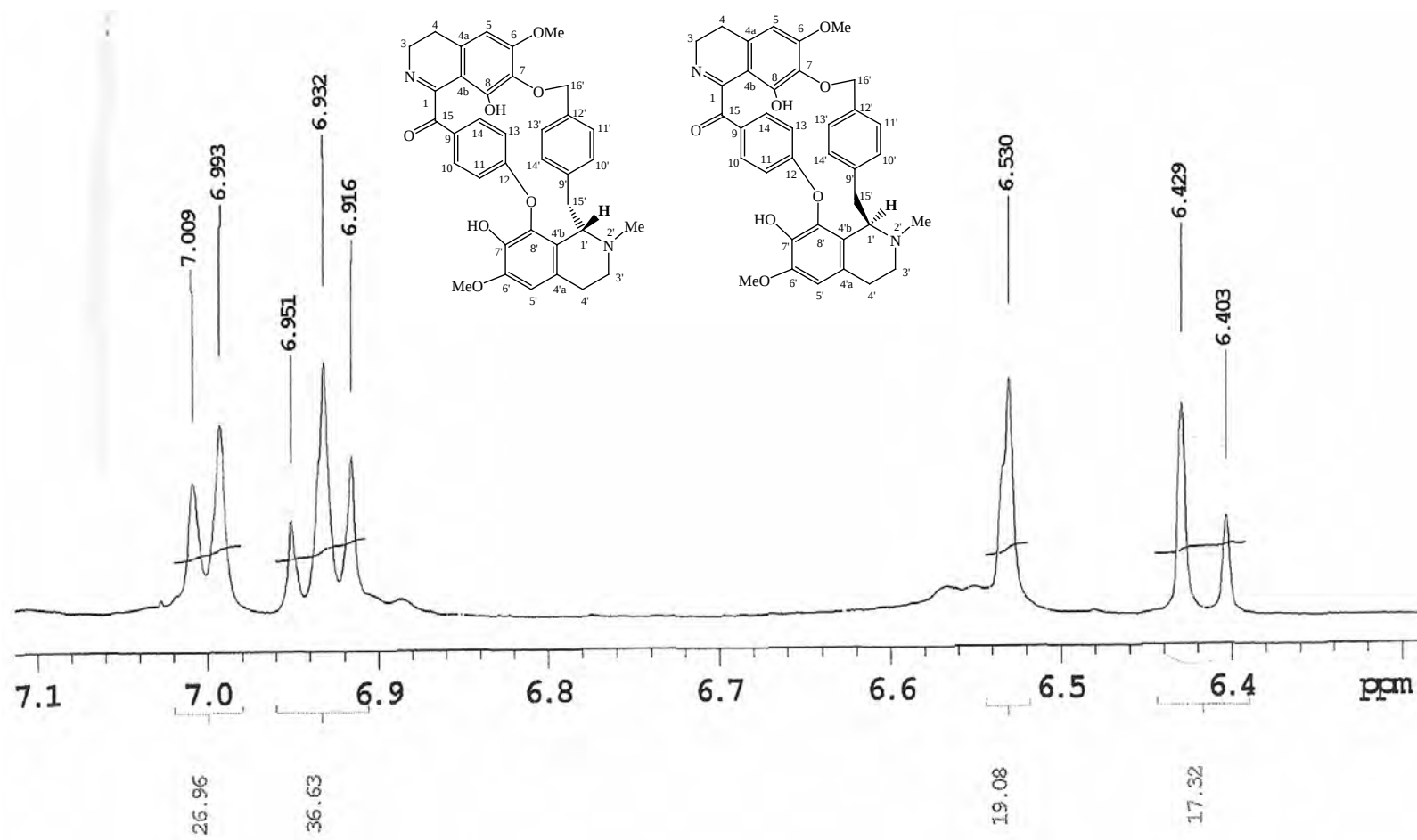
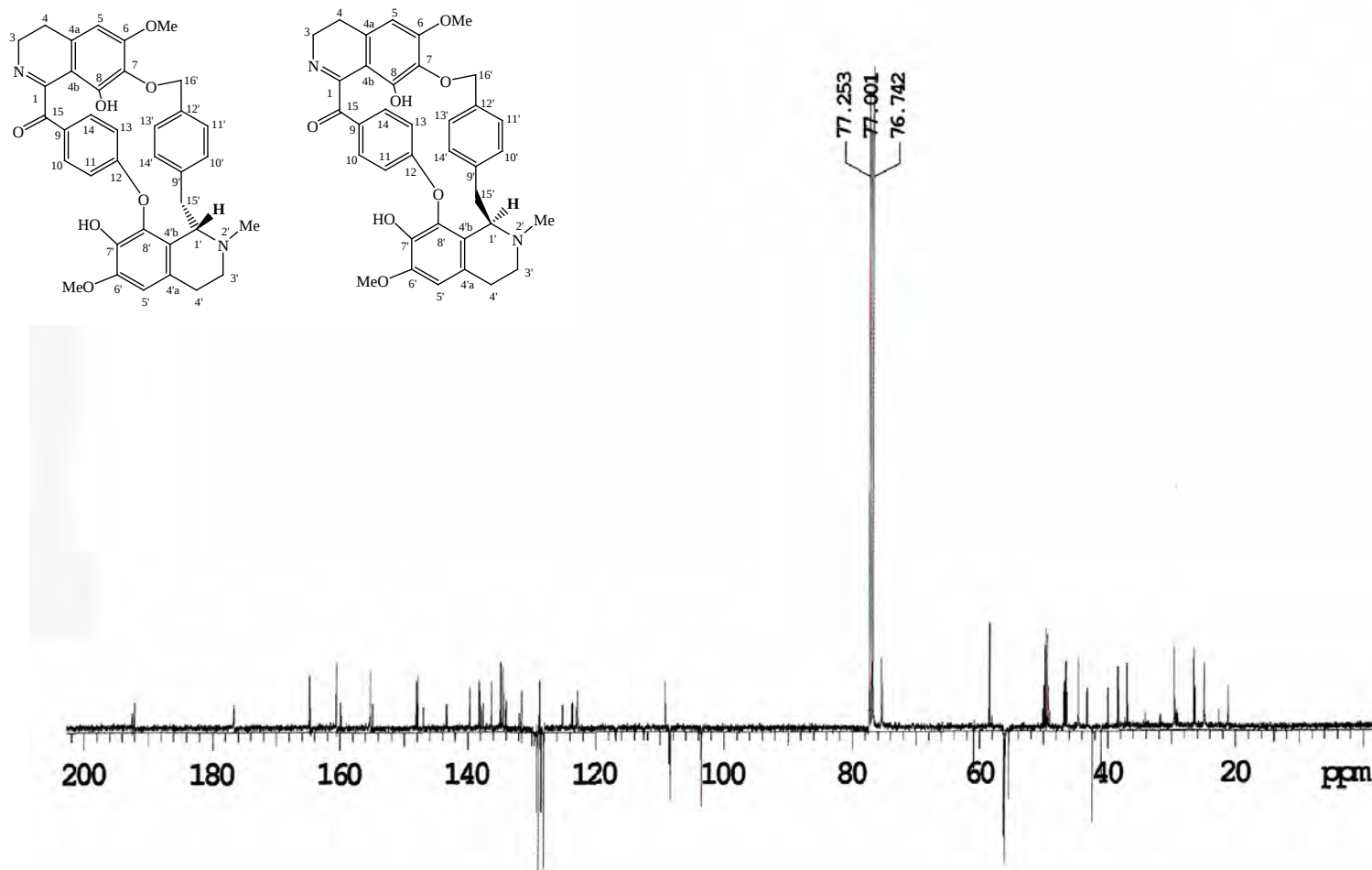


Figura 87: Expansão do espectro de RMN ^1H de CsR (CDCl_3 , 500MHz) – região de 6,3 a 7,1 ppm

Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz)

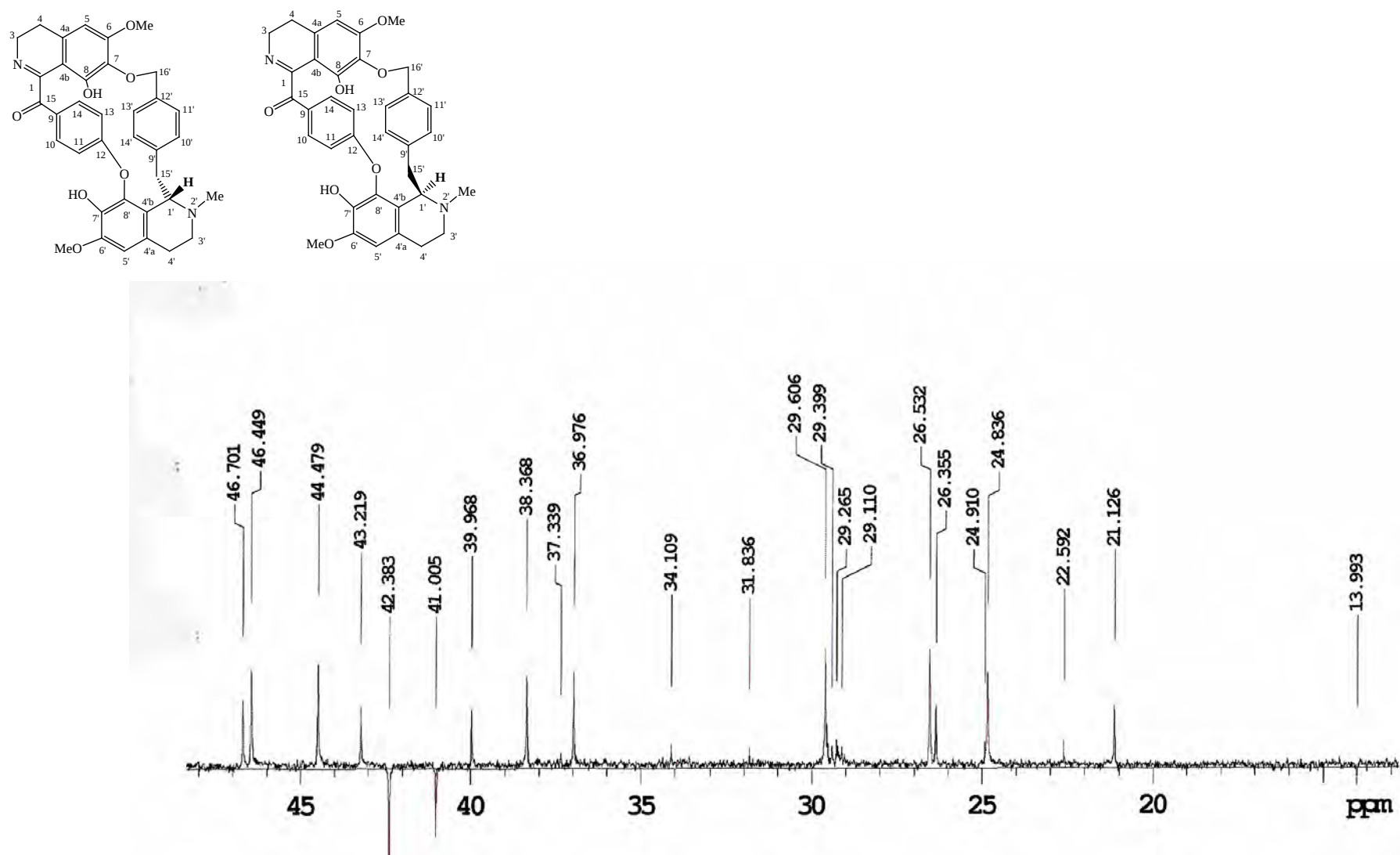


Figura 89: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 10 a 50 ppm

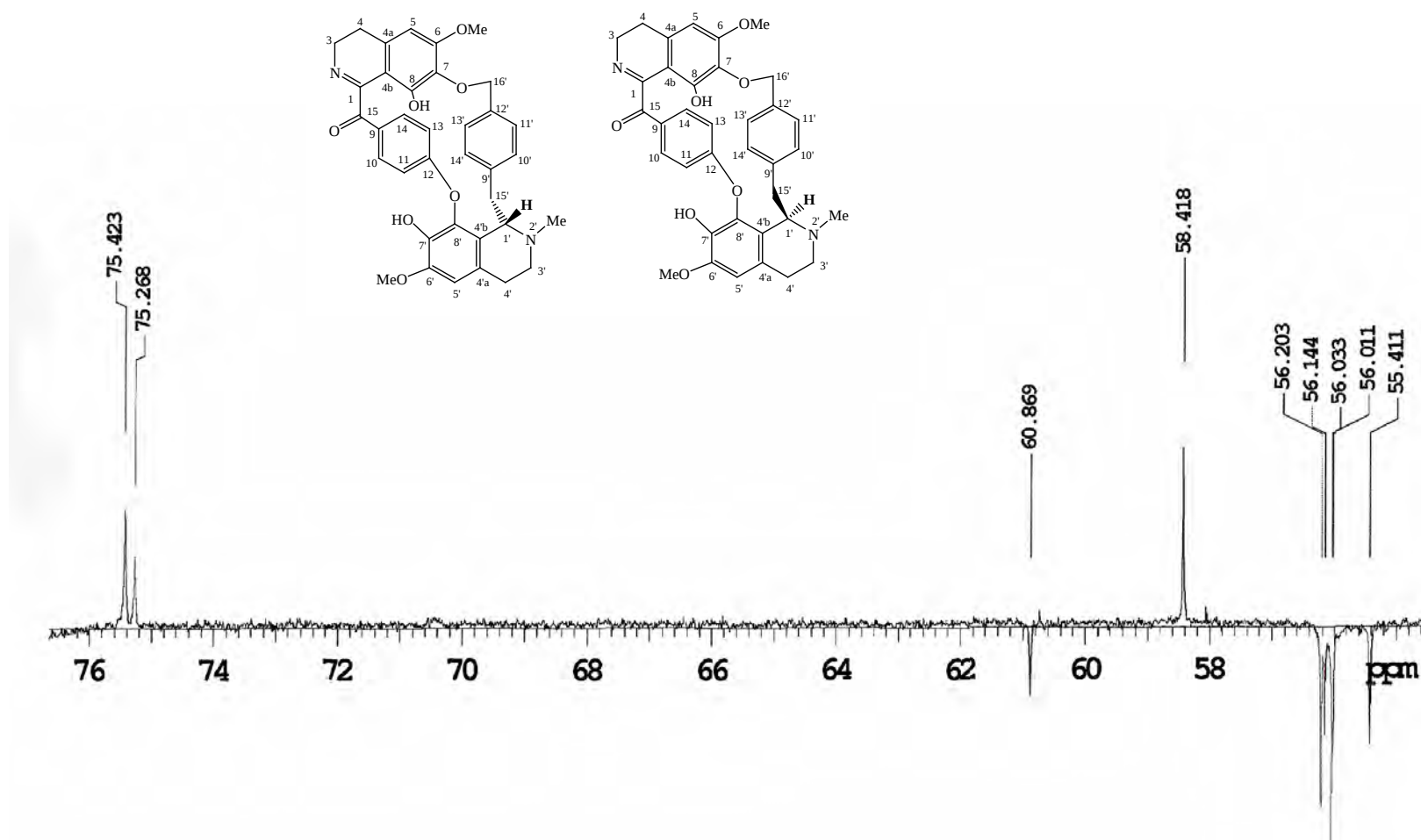


Figura 90: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 54 a 78 ppm

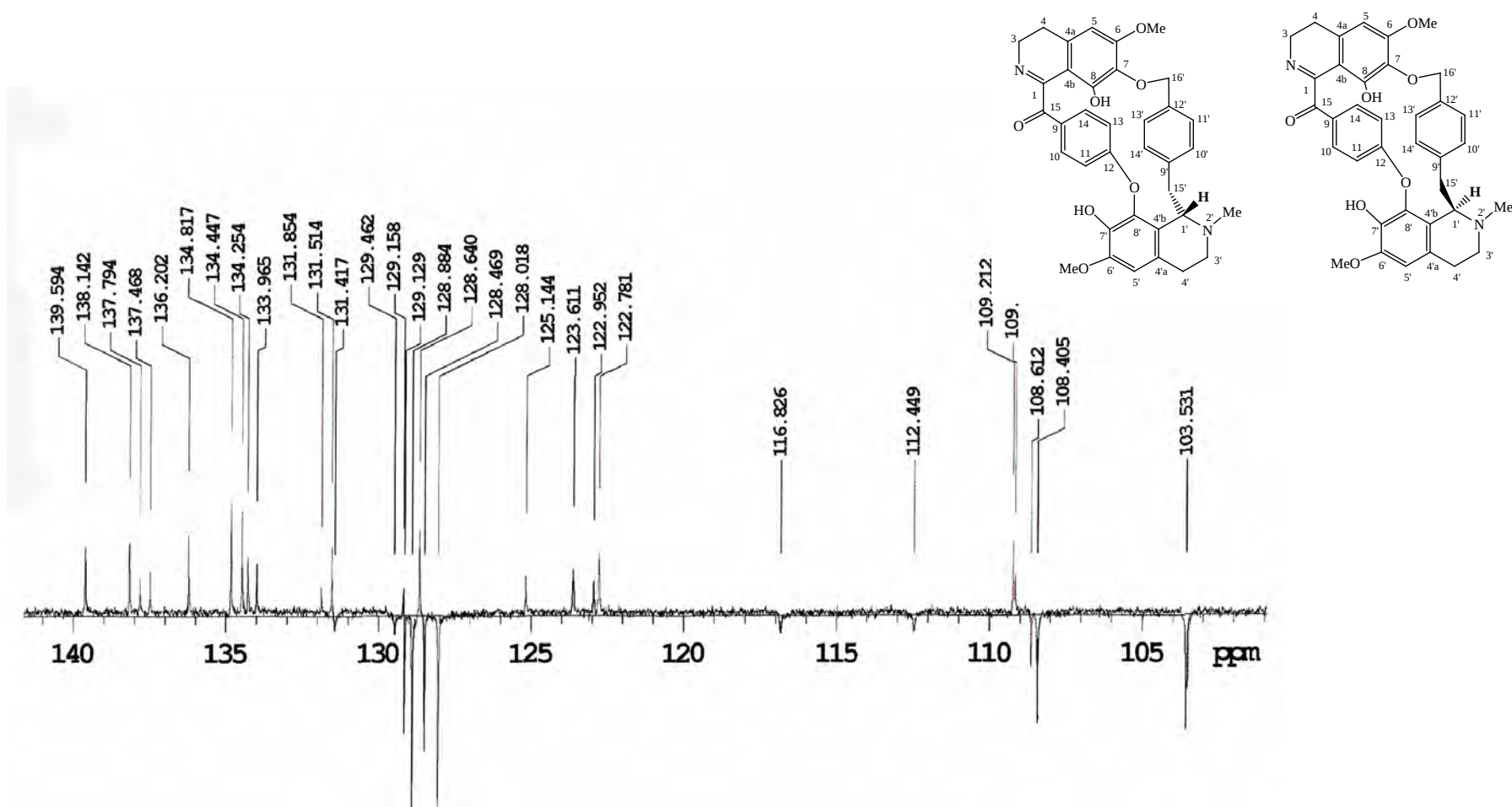


Figura 91: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 100 a 145 ppm

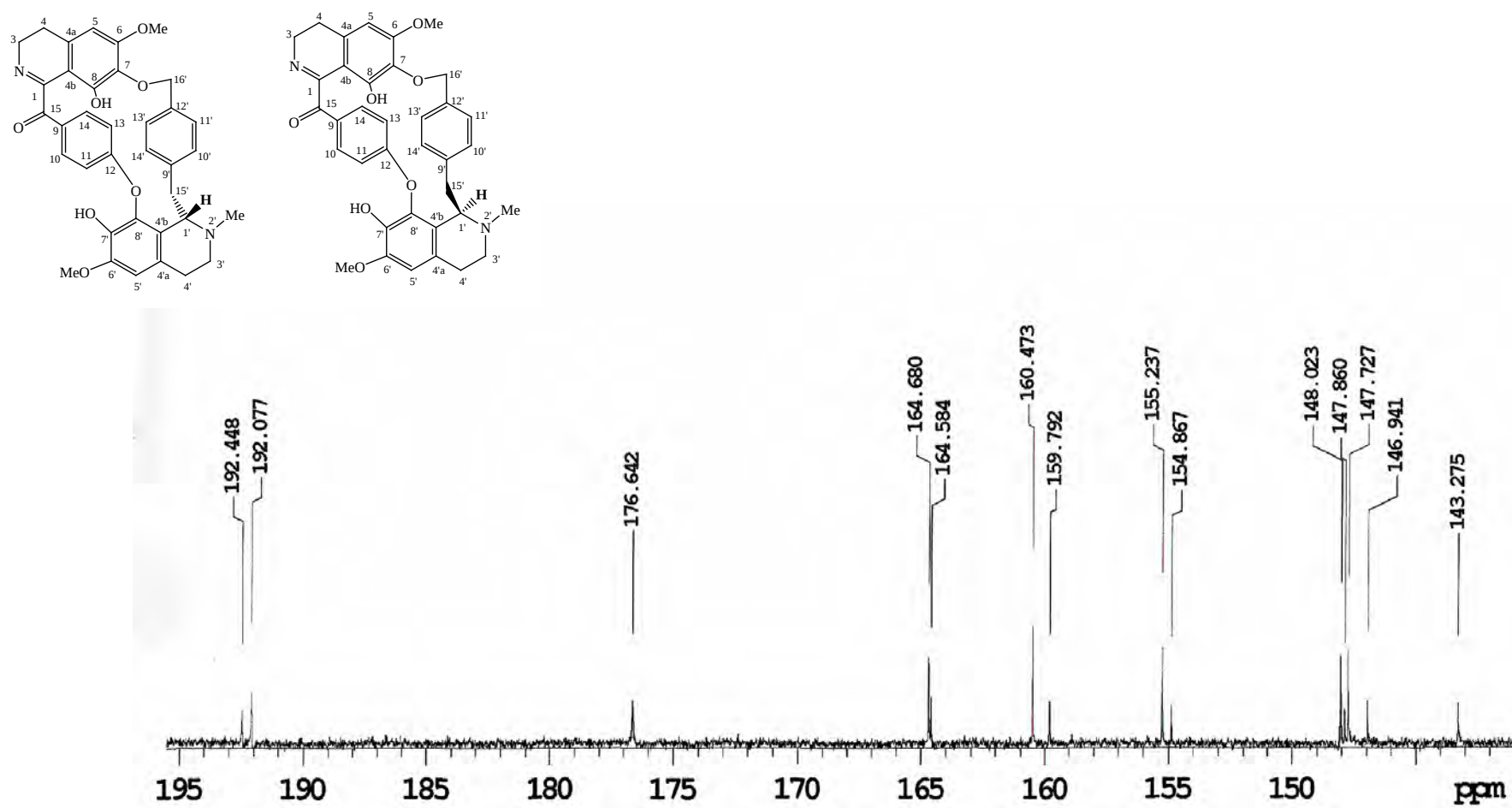
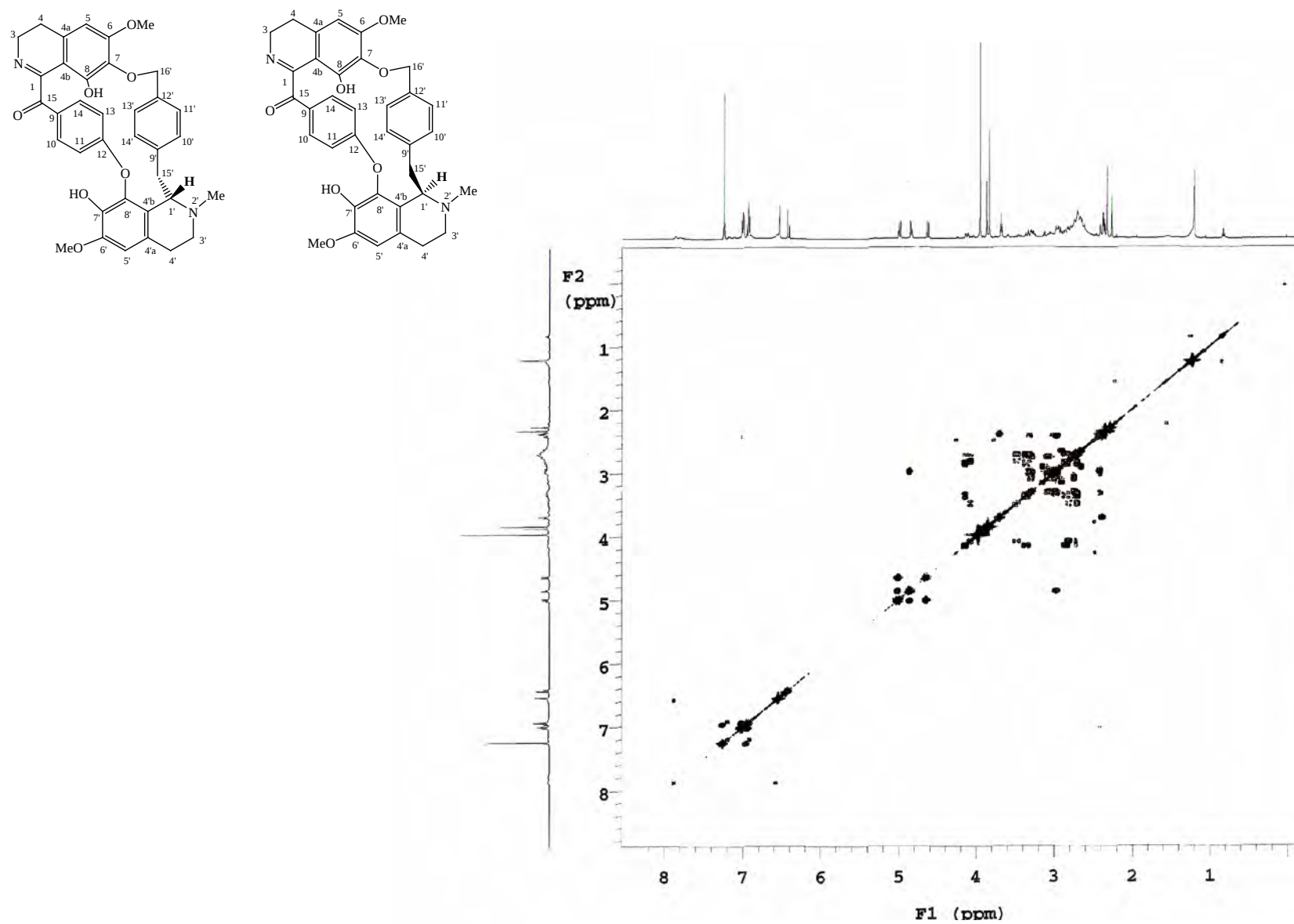
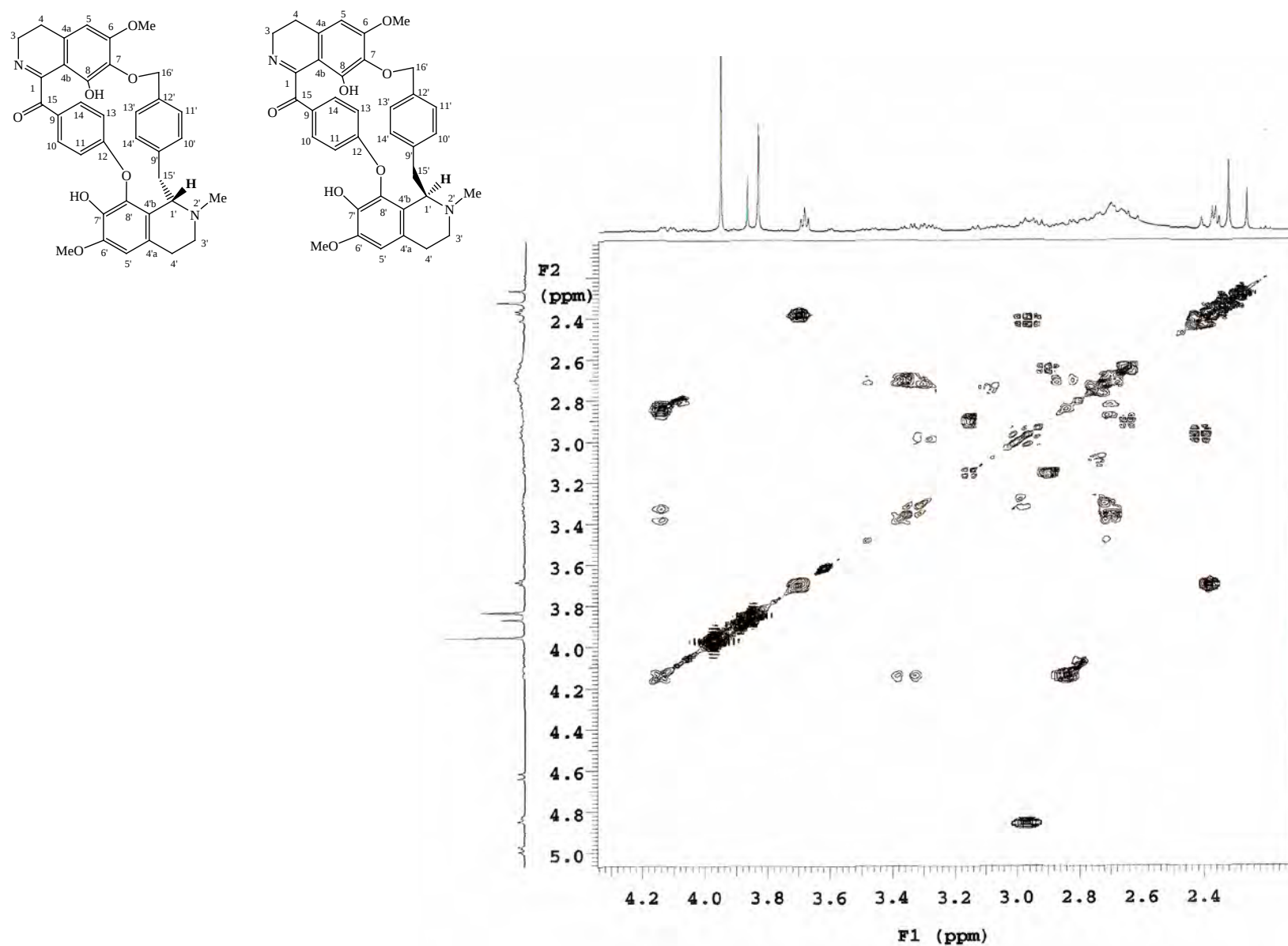
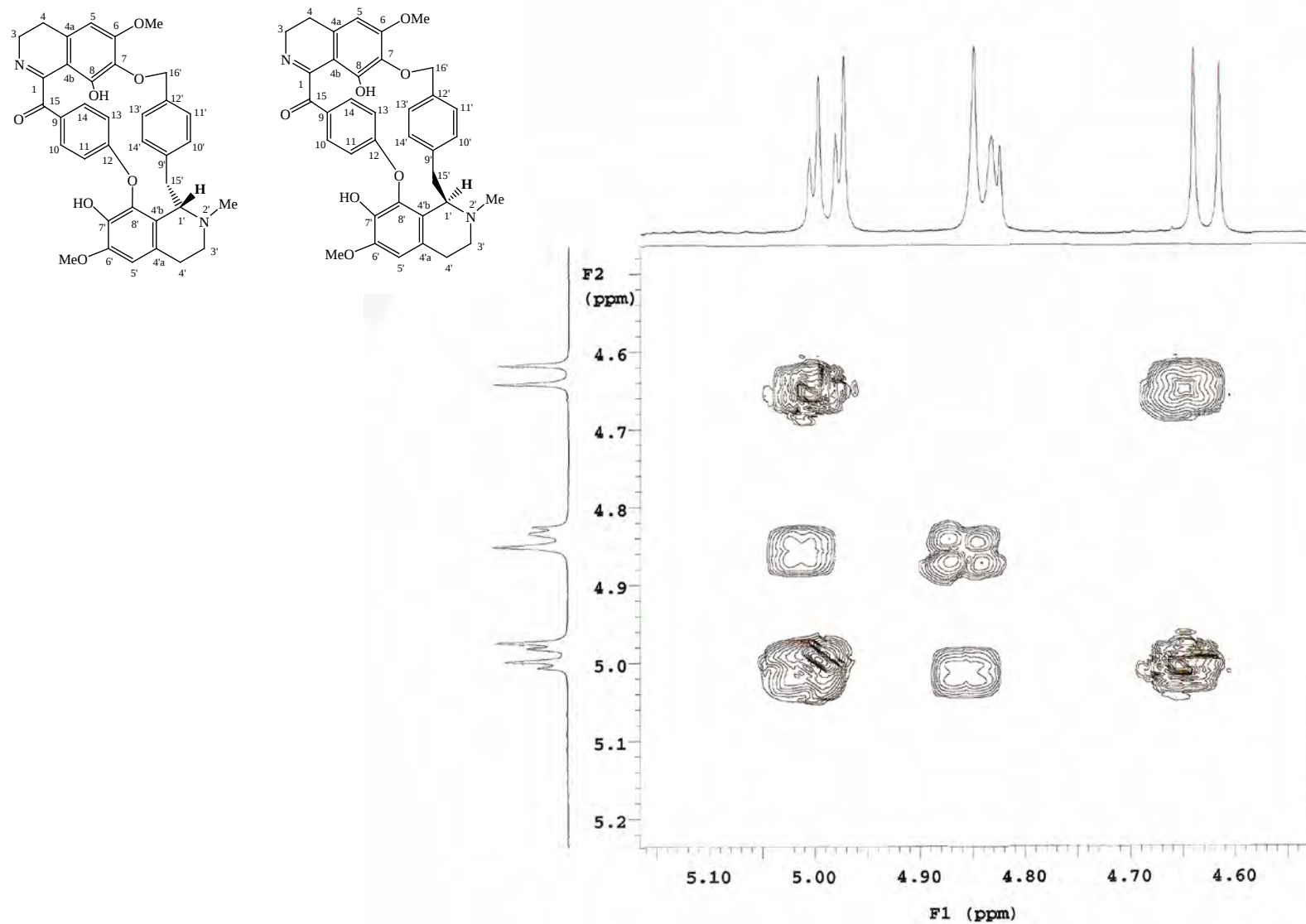
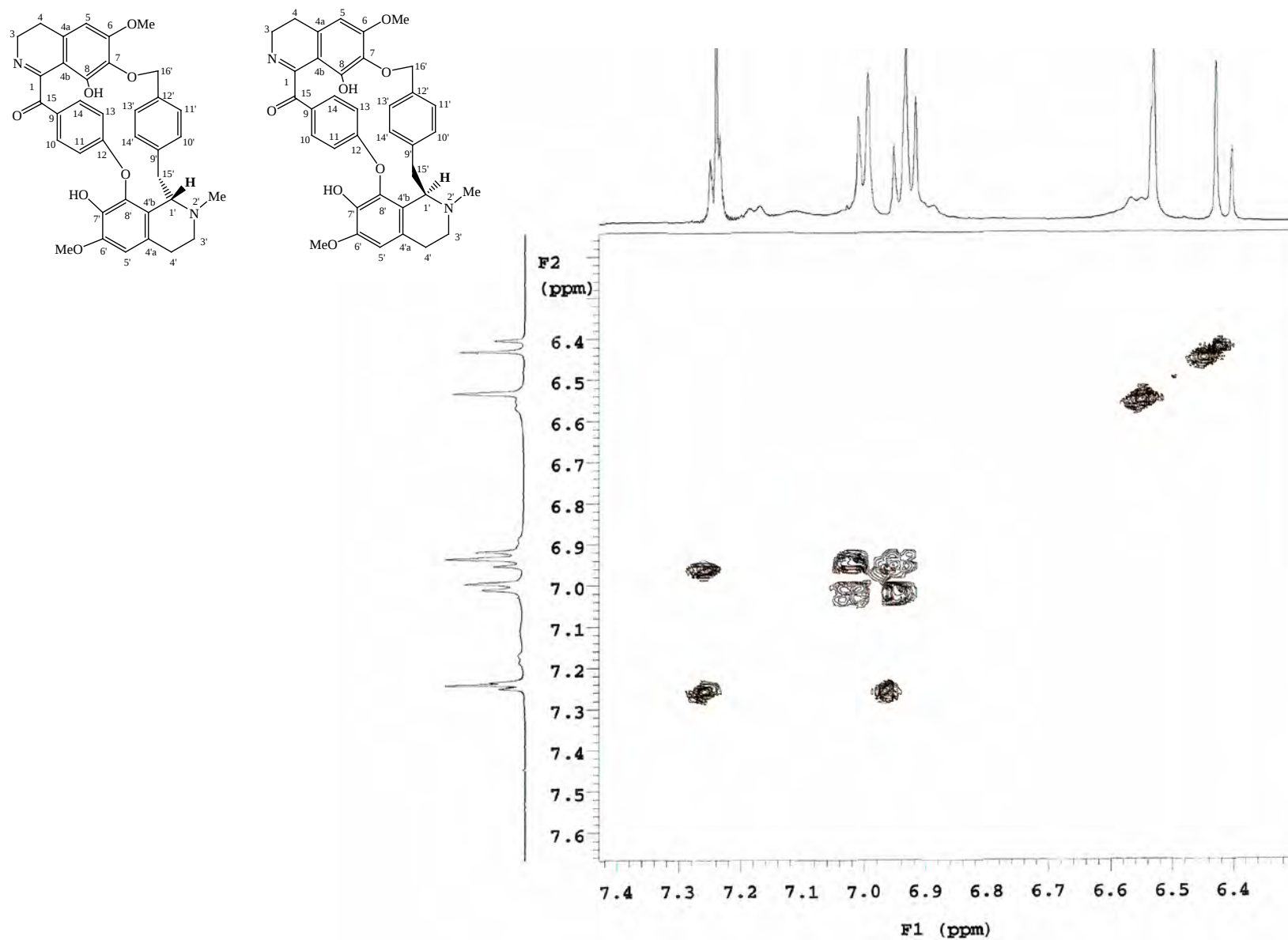


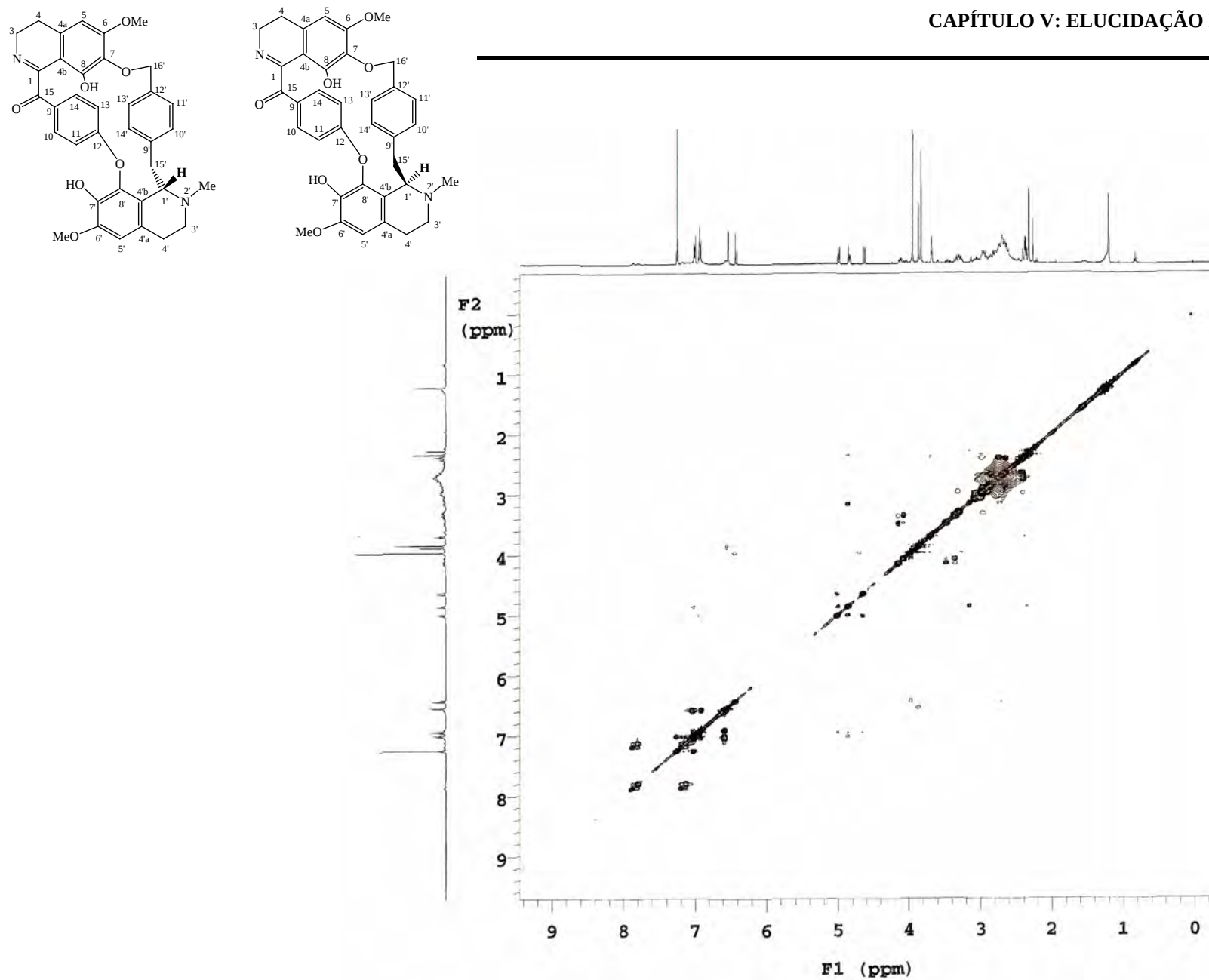
Figura 92: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de CsR (CDCl_3 , 125 MHz) – região de 140 a 195 ppm

Figura 93: Espectro de COSY de CsR (CDCl₃, 500 MHz)

Figura 94: Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 2,4 a 5,0 ppm

Figura 95: Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 4,5 a 5,20 ppm

Figura 96: Expansão do espectro de COSY de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 6,3 a 7,6 ppm

Figura 97: Espectro de NOESY de CsR (CDCl₃, 500 MHz)

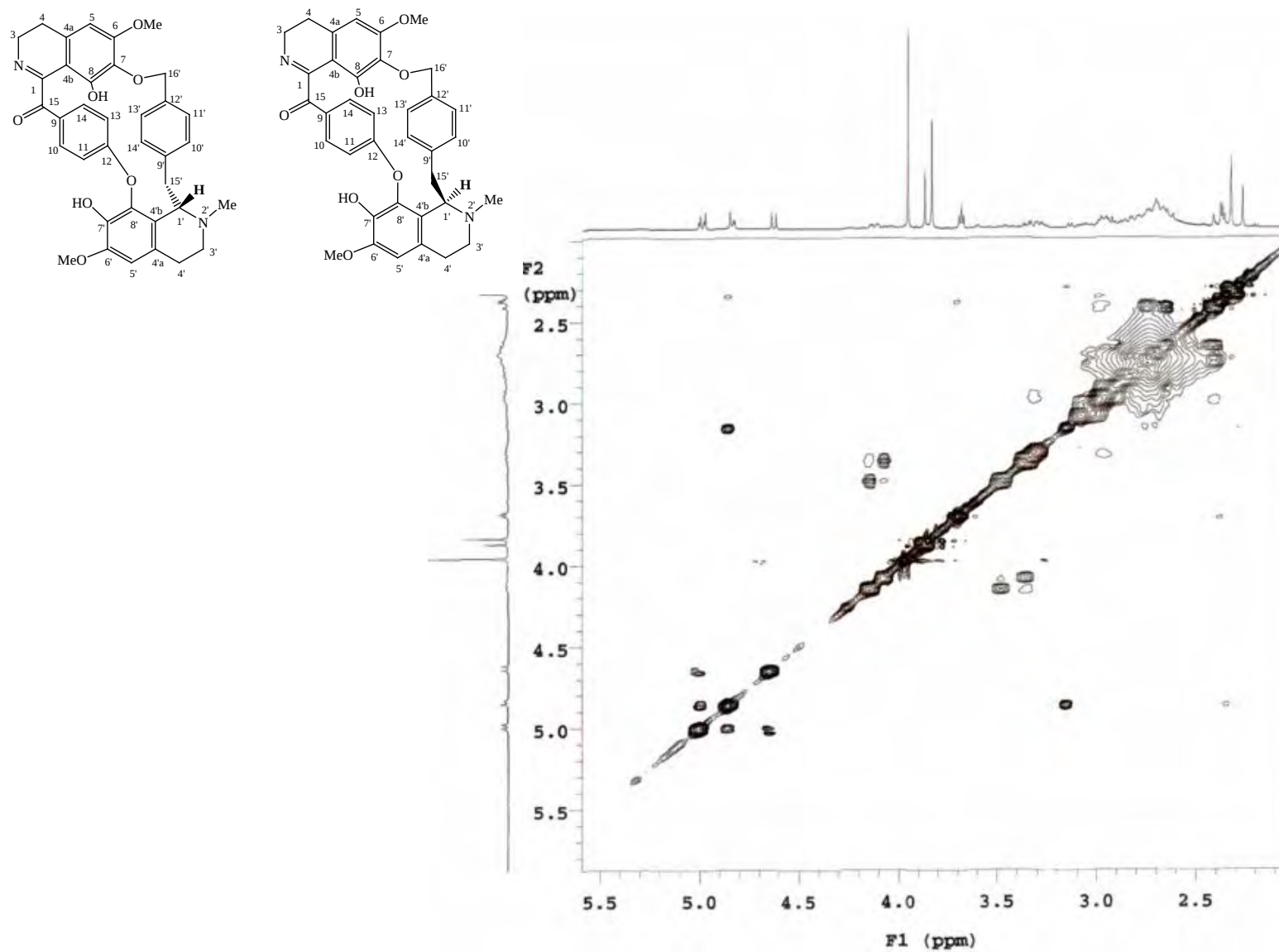


Figura 98: Expansão do espectro de NOESY de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 2,0 a 5,5 ppm

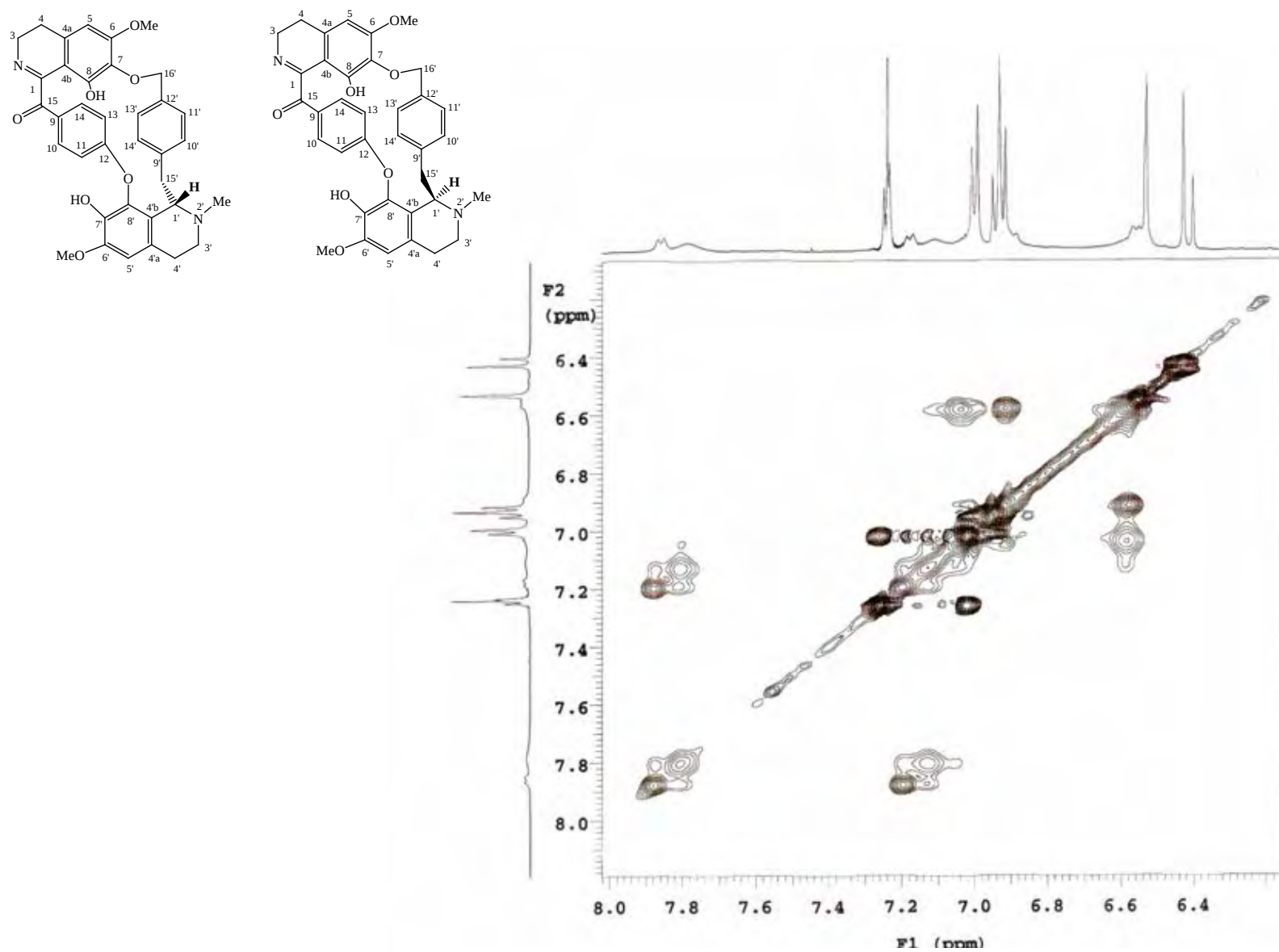
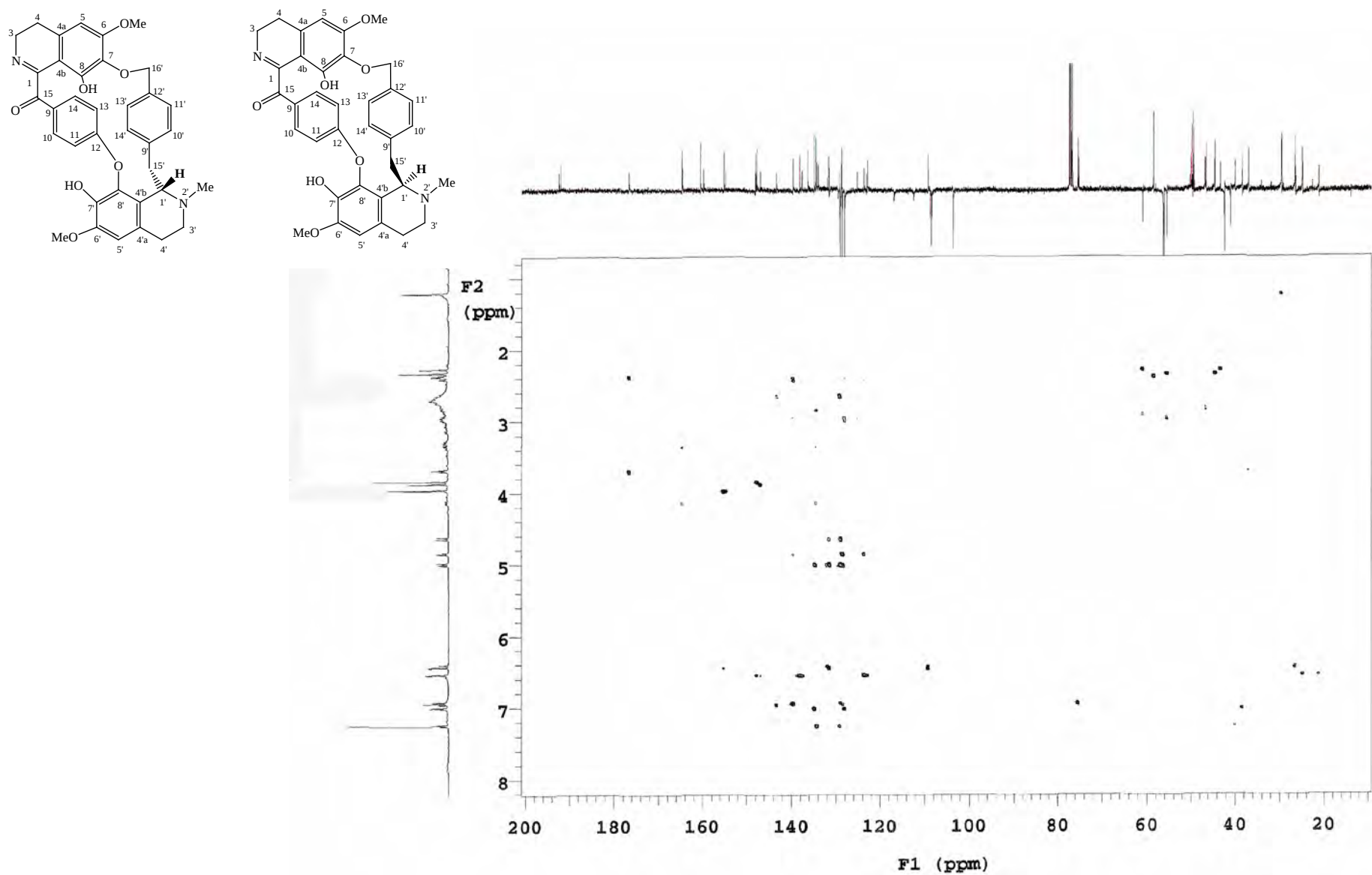
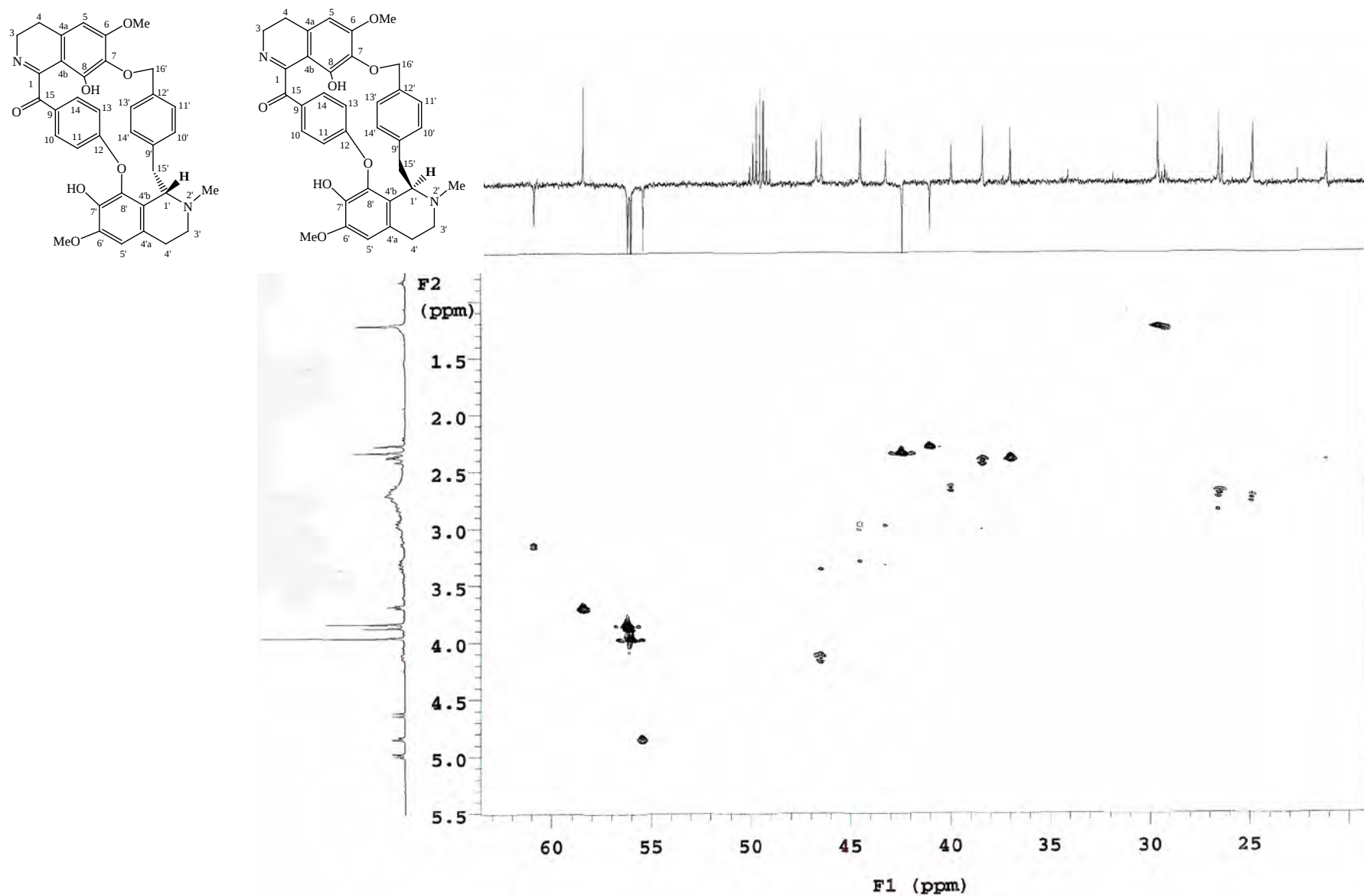
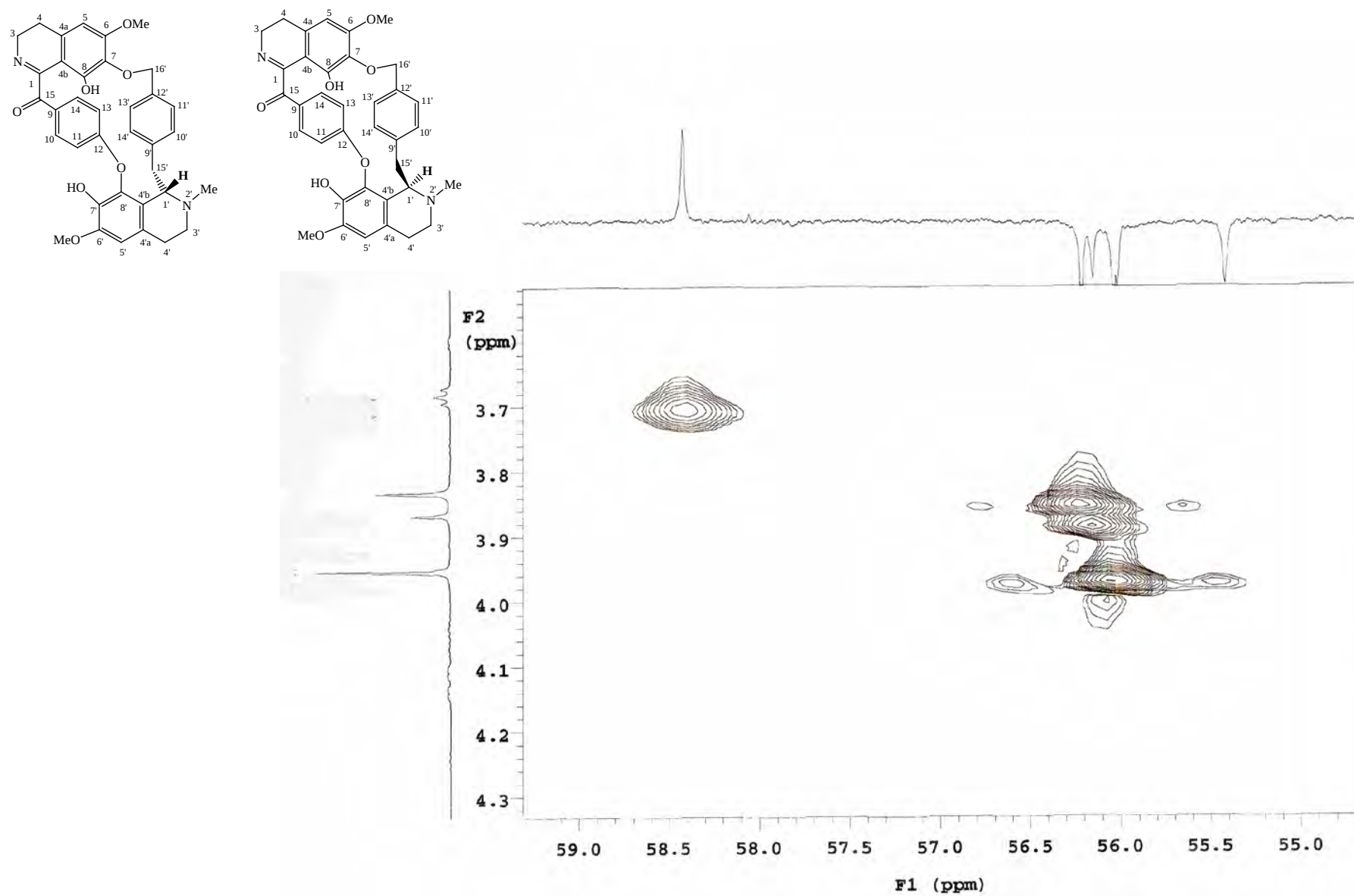


Figura 99: Expansão do espectro de NOESY de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 6,2 a 8,0 ppm

Figura 100: Espectro de HMQC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 101: Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 20 a 65 ppm

Figura 102: Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 54 a 59,5 ppm

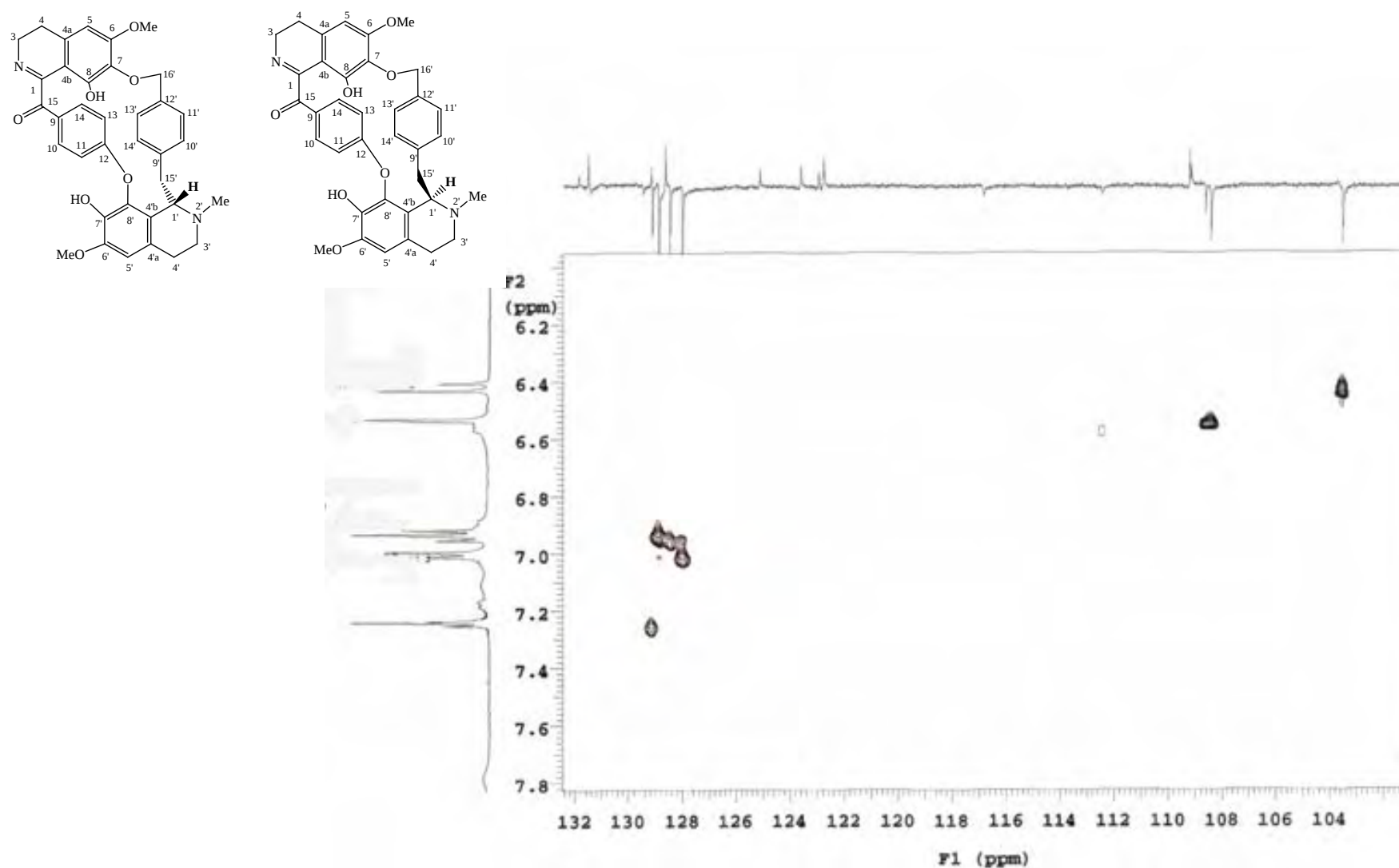
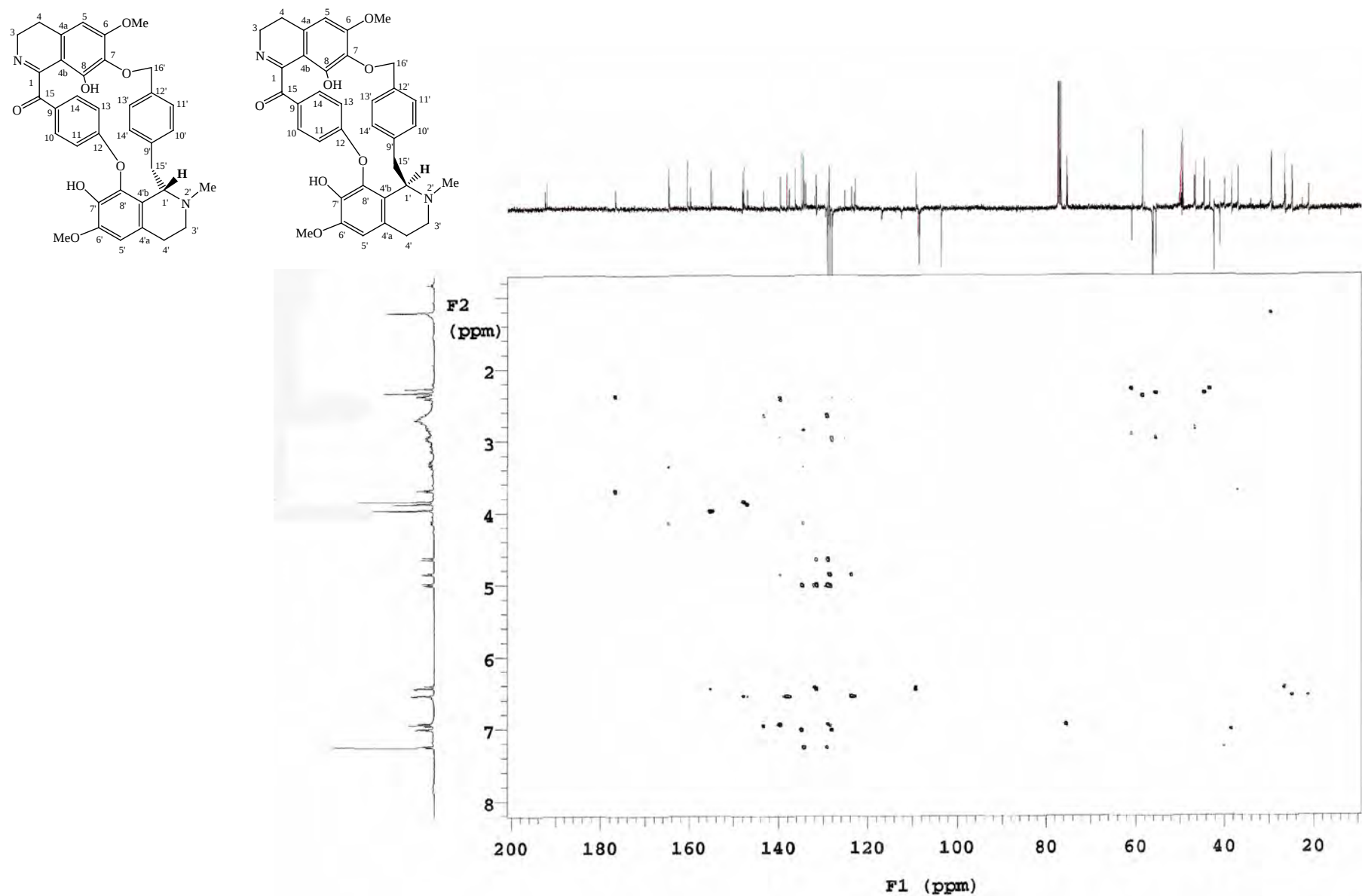


Figura 103: Expansão do espectro de HMQC de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 102 a 132 ppm

Figura 104: Espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz)

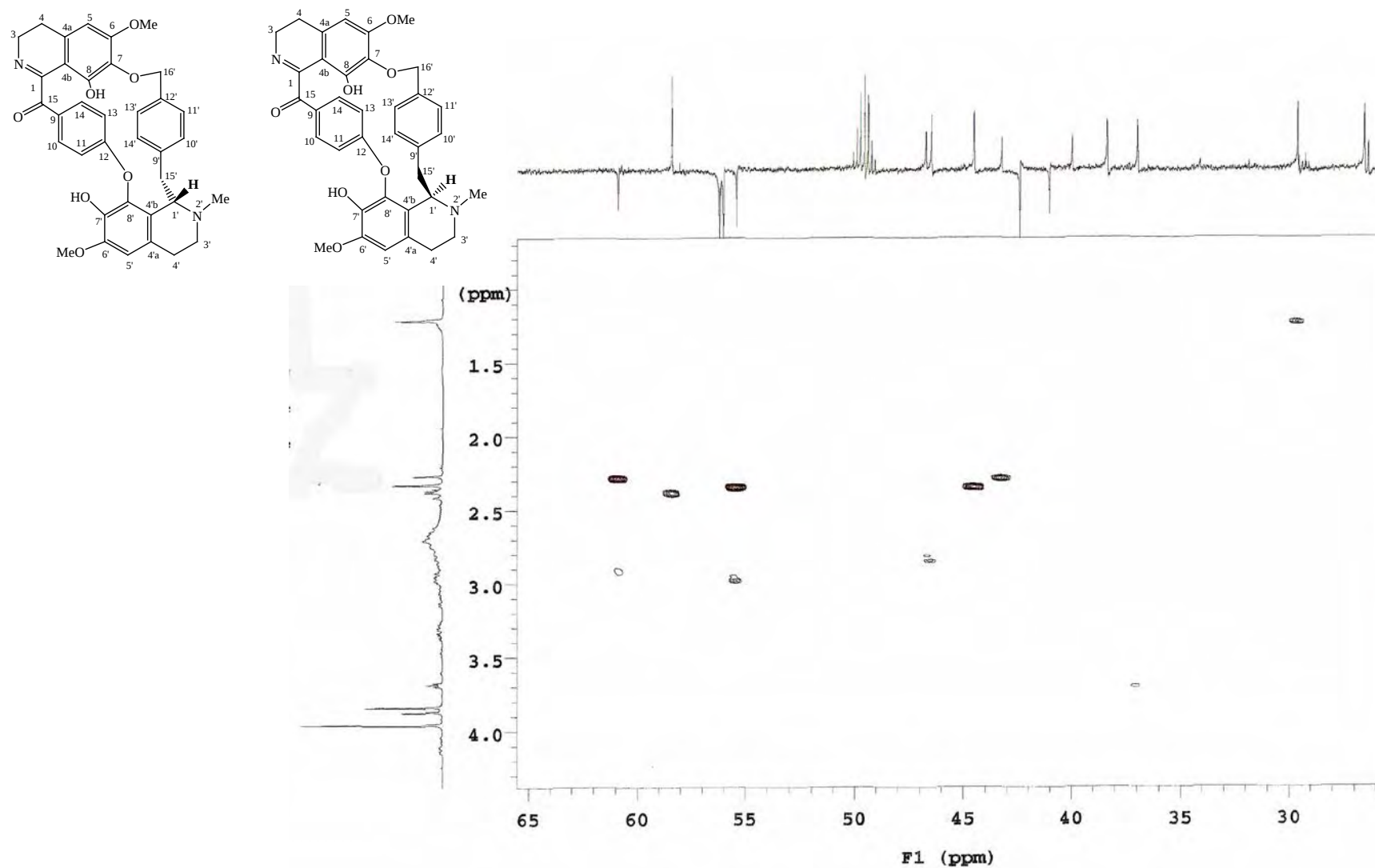
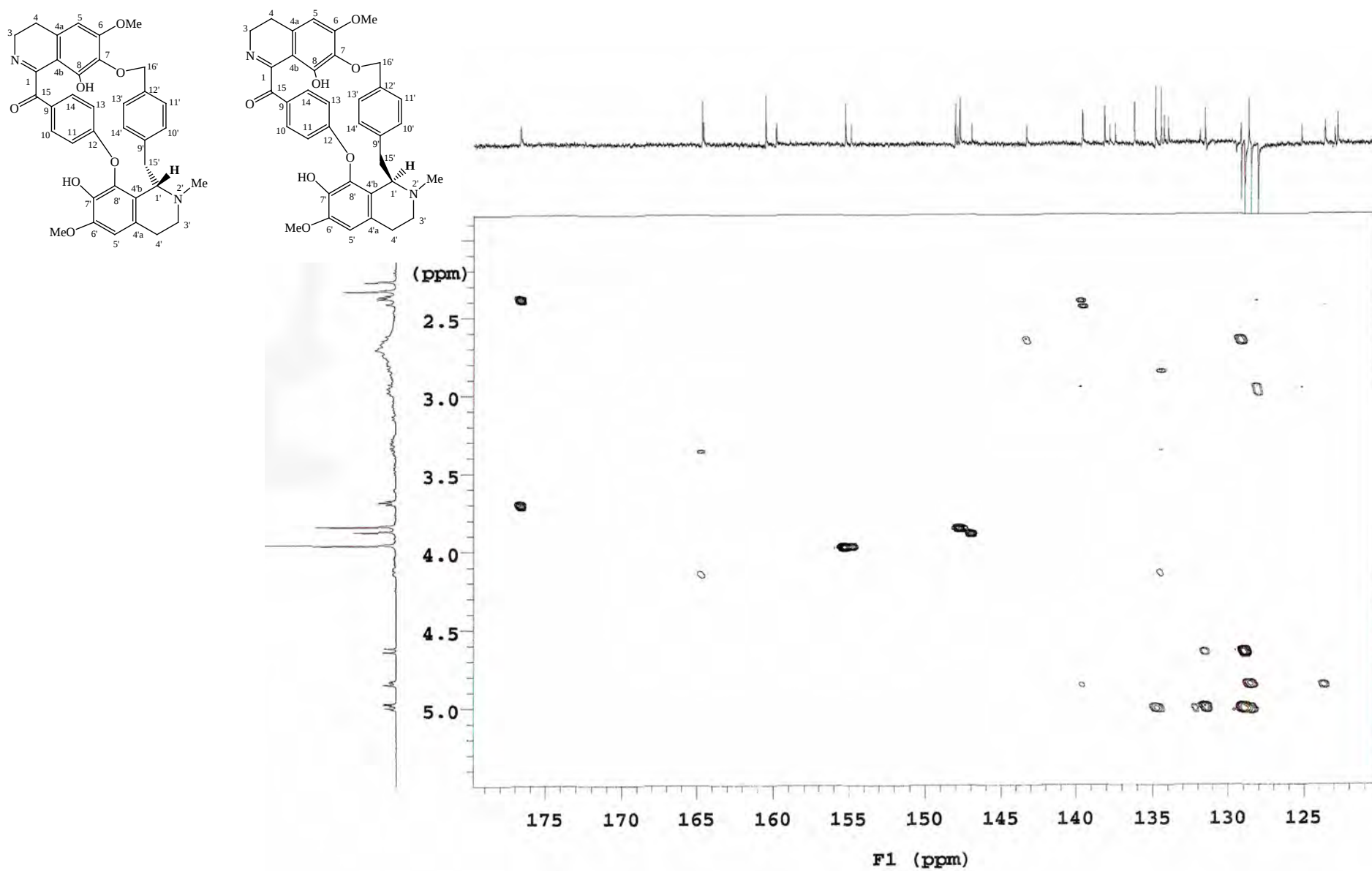
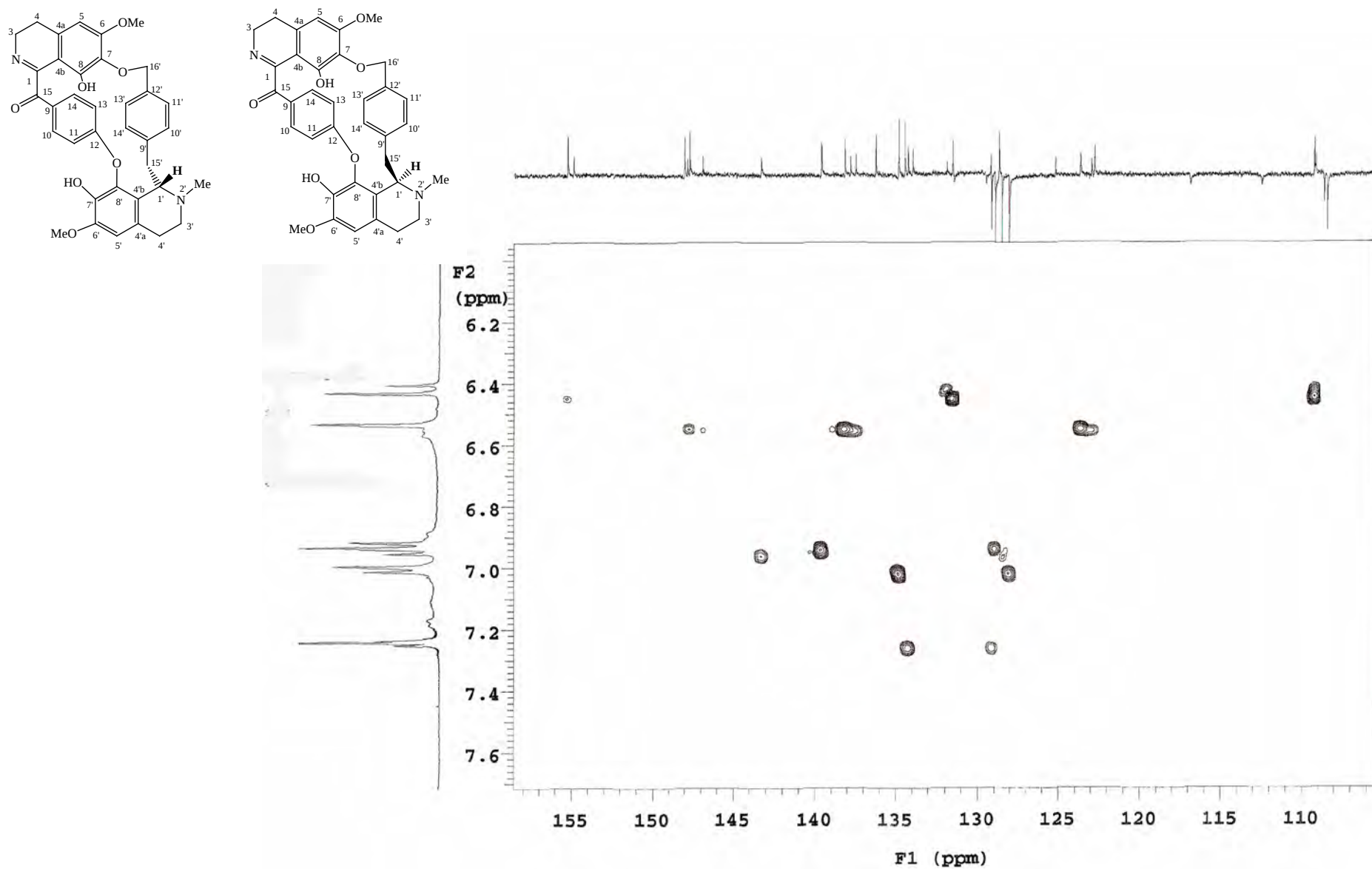


Figura 105: Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 25 a 65 ppm

Figura 106: Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl_3 , 500 MHz) – região de 124 a 176 ppm

Figura 107: Expansão do espectro de HMBC de CsR (CDCl₃, 500 MHz) – região de 109 a 154 ppm

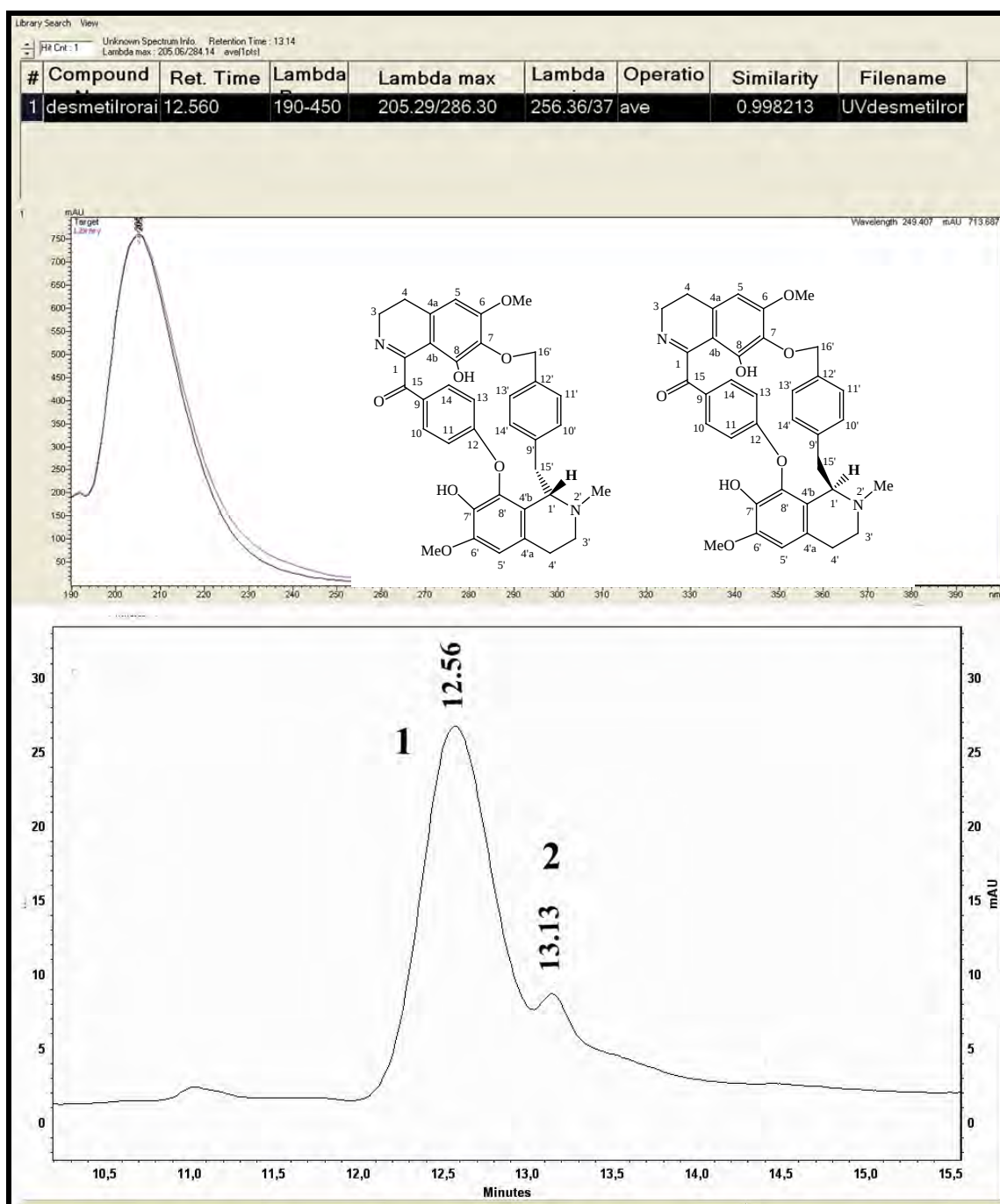
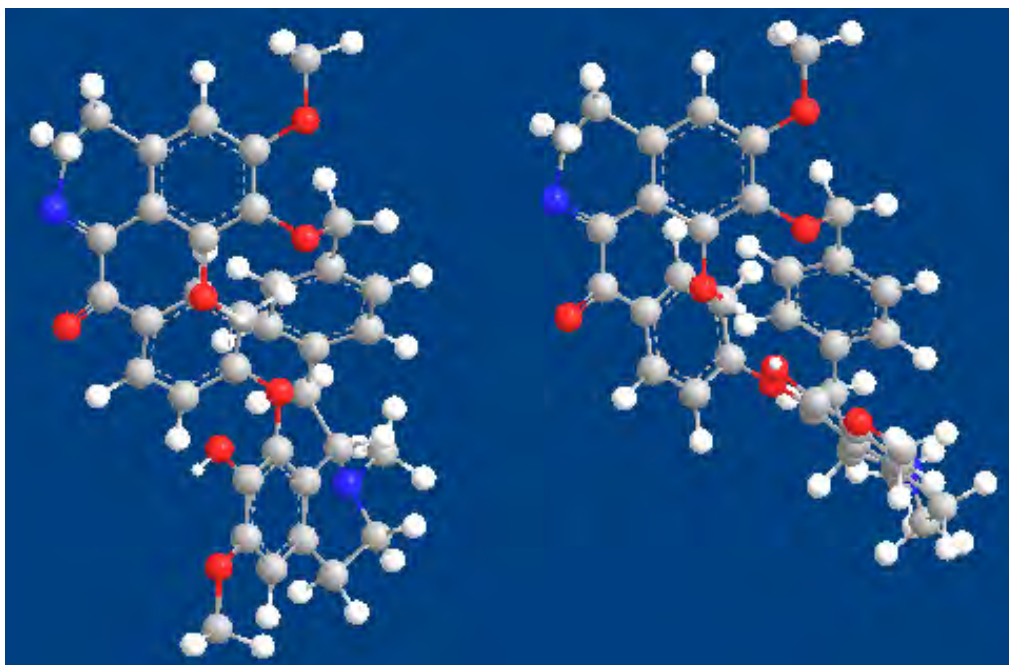


Figura 108: Cromatograma da injeção de 50 µg/mL da mistura de epímeros mostrando o índice de similaridade dos compostos CsR-1a e CsR-1b.

16 CONCLUSÕES

- Os alcalóides milonina, warifteína e metilwarifteína foram isolados, purificados e quantificados em extratos etanólico bruto das folhas através de metodologia desenvolvida e validada. O método cromatográfico desenvolvido foi validado segundo o preconizado na Resolução 899 da ANVISA, e se mostrou linear na faixa de concentração utilizada (2-100 µg/mL), seletivo (com boa separação entre os três picos cromatográficos e interferentes), robusto, preciso RSD<15% e exato (85-115%).
- No estudo da sazonalidade dos marcadores foi possível observar que houve diminuição significativa da concentração de milonina, warifteína e metilwarifteína entre o mês de fevereiro e abril. Essas diminuições proeminentes entre os meses de fevereiro e abril para as três moléculas coincidem com o período de frutificação da planta sendo verificado o aparecimento de warifteína e metilwarifteína nos frutos. Essa observação sugere a necessidade da biossíntese destes alcalóides pelos frutos.
- Em relação ao plantio, cultivo e colheita da *C. sympodialis* já se pode sugerir que a melhor época de colheita da planta é antes do surgimento dos tecidos reprodutivos (inflorescências), já que com o surgimento destes tecidos os níveis de alcalóides diminuiram significativamente.
- Através de técnicas espectrométricas e cromatográfica foi isolado uma mistura de epímeros a 7'-desmetilroraimina e a 1'-*epi*-7'-desmetilroraimina que são alcalóides bisbenzilisquinolínicos inéditos na literatura.



REFERÊNCIAS

17. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 1994. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. 2003a. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36(11): 1511-1522.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; TRINDADE, M. N.; CASTRO FARIA NETO, H. C.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. 2003b. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36(2): 199-205.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; ASSIS T. S.; 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.
- ARNOUS A H, Santos AS, Beininger RPC. 2005. **Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário.** Espaço para a saúde: 6(1):1-6.
- ARAGÃO, C.F.S. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Padronização de Extratos de *Cissampelos Sympodialis* EICHL (Milona).** 2002. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.
- BRANDÃO MGL, Cosenza GP, Moreira R, Monte-Mor R. 2006. **Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 16:408-20.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. 2000. Review: Family Menispermaceae. **The Alkaloids.** Chapman and Hall, v. 54, Chapter 1, p. 1-189.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. 1997. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brasil). **Journal of the Association for the Advancement of Science**, v. 49, nº 5/6, p. 386-394.
- BEZERRA-SANTOS, C.R.; Balestieri, F.M.P.; Rossi-Bergmann, B.; Peçanha, L.M.T.; Piuvezan, M.R. 2004. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumina-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology.** 95(23):191-197.

BEZERRA-SANTOS, C.R.; Vieira-de-Abreu, A.; Barbosa, J.M.; Bandeira-Melo, C.; Piuvezan, M.R.; Bozza, P.T. 2006. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodilais* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**. 6(7):1152-1160.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 14 de 31 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico de Boas Práticas para Fabricação de Medicamentos – **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Política Vigente para a Regulamentação de Medicamentos no Brasil. Brasília, 2004.

CAVALCANTE, H.M.; Ribeiro, T.P.; Silva, D.F.; Nunes, X.P., Barbosa-Filho, J.M. Diniz, M.F.; 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):122-30.

CERQUEIRA-LIMA, A.T.; Alcantara-Neves, N.M.; de Carvalho, L.C.; Costa, R.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Piuvezan, M.; Momtchilo, R.; Barbosa, R.; de Jesus Oliveira, E.; Marinho, A.; and others. 2010. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**. 11(11):1458-67.

CIOLA, R. 1998. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 9.

COSTA, H. F.; Bezerra-Santos, C. R.; Barbosa-Filho, J. M.; Martins, M. A.; Piuvezan, M. R. 2008. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology** (8):519-525.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. 1990. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 4. ed., Campinas: UNICAMP, p. 279.

- CORREA, M. P. 1929. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas**. Min. da Agricultura, Rio de Janeiro, v. 5, p. 320.
- CÔRTEZ, S. F. 1992. **Ação espasmolítica de warifteína**. Um alcalóide bisbenzilisquinolínico isolado de *Cissampelos sympodialis* EICHL. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- CÔRTEZ, S. F.; ALENCAR, 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.
- DINIZ, M. F.F.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; SILVA, M. V. B.; MEDEIROS, I. A. 2004. Ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl em ratos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** 8(2): 135-142.
- DINIZ, M. F.F. 2000. **Ensaios toxicológicos pre-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl**. Um alcalóide bisbenzilisquinolínico isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Tese (Doutorado em Produtos Naturais) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A. 2006. **Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica e Clínica**. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 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.
- DUBBER, M. J.; SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; KANFER, I. 2005. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 37: 723-731.
- EICHLER, A. W. 1887. **Flora Brasilienses**, v. 13, p. 121.
- FERRO AFP, Bonacelli MBM, Asad ALD. 2006. **Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira**. *Gestão & Produção*, 13(3):489-501.
- FREITAS, M. R. ; CÔRTEZ, S. F. 1996. Modification of Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of espasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Journal Pharmacy Pharmacology**. 48(3): 332-6.
- FREITAS, M. R.; ALENCAR, J. L.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA, J. M.; GRAY, A. I. 1995. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry** 40(5): 1553:1555.

FREITAS, M. R.; LEMOS, V. S.; QUEIROGA, C. E. G.; THOMAS, G.; MEDEIROS, I. A.; CÔRTEZ, S. F. 2000. Mechanisms of the contractile effect of the hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl in the rat aorta. **Phytomedicine** 7(1): 63-67.

FREITAS, M. R. 1994. **Alcalóides isolados das folhas de *Cissampelos sympodialis* EICHL: elucidação estrutural de Milonina, um novo alcalóide morfinandienônico e estudo do mecanismo de ação de warifteína**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Vol 30, N°2, 374-381.

HØGEDAL, B.D. & MØGAARD, P. 2000. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochemical Systematics and Ecology** (28)949-962.

HOOK, I.; Poupat, C.; Ahond, A.; Guénard, D.; Guerite, F.; Adeline, M.T.; Wang, X.P.; Dempsey, D.; Breuillet, S.; Potier, P. 1999. Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*). **Phytochemistry** (52) 1041-1045.

http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_addition acessado em 05/11/2011.

JAGETIA, G.C. & Baliga, M.S. 2005. The effect of seasonal variation on the antineoplastic activity of *Alstonia scholaris* R.Br. in HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology** (96)37-42.

KASAKEVICH, YURI e Rosário LoBrutto. 2007. HPLC for Pharmaceutical scientists. Editora Wiley-Interscience.

LIMA, L. R.; XAVIER, H. S.; MEIRA, J. L.; NETO, P. J. (2006). Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(4): 562-567.

LIRA, G. A. **Novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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

Manual de boas práticas em biodisponibilidade : bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Vol. I. Brasília: **ANVISA**, 2002.

MARINHO, A.F. 2008. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da warifteína em extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Milonina).

Dissertação. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos. CCS/UFPB.

MELO, P. S.; Cavalcante, H. M. M.; Barbosa-Filho, J. M.; Diniz, M. F. F. M.; Medeiros, I. A.; Haun, M. 2003. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Lettes** 143-151.

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.

MOURA MD, Carvalho ACB, Moreira AL, Guerra MFL, Oliveira RAG, Diniz MDFM et al. 2001. **As plantas medicinais nas feiras de saúde da Paraíba**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 37(2):119.

MOREAU, R.L.; SIQUEIRA, M.E.P. Toxicologia analítica. Guanabara-Koogan. 2008.

Mobot: <http://www.tropicos.org/Name/42000034?tab=maps>, acessado em 04/11/2011.

MGBEOJI, I. 2007. Global Biopiracy: Patents, Plants, and Indigenous Knowledge. **European Review of Agricultural Economics** 34(4):539-541

MUKHERJEE, Rabindranath and Keifer, P. A.2003. Warifteine and methylwarifteine: ¹H and ¹³C assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry** (41): 213-218.

NASCIMENTO, T. G. 2004. **Desenvolvimento e Validação de métodos Bioanalíticos para quantificação simultânea de fármacos em plasma humano**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

PARANHOS, J.T.; Fragoso, V.; Silveira, V.C.; Henriques, A.T.; Fett-Neto, A.G. 2009. Organ-specific and environmental control of accumulation of Psychollatine umbellate. **Biochemical Systematics and Ecology** (37): 707-715.

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

RESOLUÇÃO – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de março de 2002.

RODRIGUES AG. 2006. **Fitoterapia no Sistema Único de Saúde**. Anais da V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de plantas Medicinais, Joinville.

SANTOS, C. R. B. 2002. ***Cissampelos sympodialis* EICHL. (Menispermaceae) inibe a produção de imunoglobulina E (IgE) e proliferação celular em modelo experimental de asma**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. 1997. **Practical HPLC method development**. 2nd edition, John Wiley & Sons, p. 1-18.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; AGRA, M. D.; DINIZ, M. D. F.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. 1995. Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leukocytes. **Phytotherapy Research** 9(7): 473-477.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; DUARTE, J. C.; SOUZA, D. P. 1997a. Bronchodilator activity of an aqueous fraction of an ethanol extract of leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine** 4(3): 233-238.

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

THOMAS, G.; SELAK, M.; HENSO, P. M. 1999. Effects of the aqueous fraction of ethanol extracts of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl in human neutrophils. **Phytotherapy Research** 13(1): 9-13.

VEIGA Junior VF, Mello JCP. 2008. **As monografias sobre plantas medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(3):464-71.

