

1.06.04 – Química/Química Analítica

VALIDAÇÃO DE PLANEJAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES APORFÍNICOS NA PLANTA *Unonopsis duckei* R.E.FR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL.

Pablo Rodrigo N. Rocha,¹ Felipe M. A. da Silva,² Giovana A. Bataglion,² Patrícia K. Soares,³ Marcos N. Eberlin,⁴ Hector Henrique F. Koolen⁵

1. Mestre em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
2. Pesquisadores, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
3. Pesquisadora, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
4. Pesquisador, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
5. Pesquisador, Universidade do Estado do Amazonas (UEA) / Orientador

Resumo:

Validou-se um método quimiométrico de extração e quantificação simultânea de 5 alcaloides aporfínicos (anonaína, normuciferina, glaziovina, norglaucina e glaucina) a partir das partes aéreas da planta *Unonopsis duckei* R. E. Fr por meio de cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas sequencial. Para atingir este objetivo desenvolveu-se um planejamento de experimento simplex-centróide com 4 solventes (metanol, clorofórmio, *n*-hexano, e acetona) com os quais preparou-se 23 soluções em proporções determinadas (4 unitárias de 100%, 6 binárias de 50%, 4 terciárias de 33,33%, 4 quaternárias de 62,5% + 12,5% e 5 quaternárias de 25%) com o fim de identificar a mistura de solução com a maior capacidade de extração dos analitos em amostras de 1 g de folhas. A partir dos extratos preparou-se 23 soluções metanólicas (1 mg/mL) que foram analisadas exploratória e quantitativamente. A análise exploratória foi desenvolvida em um sistema UHPLC-ESI(+)/Q-TOF e a quantitativa em um sistema UHPLC-ESI(+)/QqQ. Para a corrida cromatográfica ajustaram-se os parâmetros tempo de retenção e resolução afim de otimizar os processos de separação cromatográfica. Para a otimização do processo de detecção e identificação espectrométrica ajustaram-se o potencial do orifício, energia de colisão, potencial de saída da cela de colisão e a transmissão dos analisadores. Validou-se as figuras do mérito: seletividade, linearidade, precisão (ensaio interdia), exatidão (percentual de recuperação) e os limites de detecção e quantificação. Os resultados obtidos indicaram que a amostra de nº 5 de composição binária metanol/clorofórmio (1:1) apresentou o melhor rendimento por grama de folha permitindo obter 6,79 µg/g de anonaína, 131,10 µg/g de glaziovina, 40,57 µg/g de norglaucina e 23,69 µg/g de glaucina. A concentração da normuciferina ficou abaixo de seu limite de quantificação.

Palavras-chave: *Unonopsis duckei*, Quimiometria, Validação.

Introdução:

O gênero *Unonopsis* (Annonaceae) é tipicamente neotropical constituído por árvores e arbustos com cerca de 47 espécies catalogadas e no Brasil a espécie *U. duckei* é restrita à região amazônica brasileira (MAAS et al., 2007). Sabe-se que para o gênero *Unonopsis* são relatados predominantemente os derivados de isoquinolina, principalmente aporfina, oxoaporfina e tetrahidroprotoberberinas (SILVA et al., 2014, 2016). Dentre as aplicações das *Unonopsis* spp. incluem o combate à artrite, bronquite, reumatismo e diarreia, todos atribuídos aos alcalóides (JOVEL et al., 1996). Os medicamentos derivados de alcaloides são um mercado mundial de US\$ 4 bilhões (DEHGHAN, 2010). Entre as espécies amazônicas descritas, *U. duckei* (envira cascuda ou envira preta), mostrou-se uma fonte prolífica de alcalóides bioativos (SILVA et al., 2014). Investigações anteriores de espectrometria de massa (MS) revelaram a presença de aporfina e oxoaporfina, além da proaporfina glaziovina para esta espécie (SILVA et al., 2014). Assim, isolar alcaloides e melhorar a maneira de extraí-los é de extrema importância. Estudos anteriores indicaram o potencial dos alcalóides presentes em *U. duckei*, especialmente glaziovina que exibem atividades promissoras como o tranquilizante, o ansiolítico, o anticancerígeno, a anti hepatite B, antiprotozoários, anti-ulcerogênicos e antivirais (Herpes simplex tipo 2) (CHENG ET AL., 2007). Com relação ao processo de isolamento de alcalóides a escolha do método de extração e dos solventes é fundamental. Uma vez que a composição química obtida, tanto qualitativa e quantitativa dependem das propriedades do solvente a otimização pode auxiliar na obtenção do máximo de rendimento com o mínimo de impurezas (SOARES ET AL., 2009). Diante do acima exposto buscou-se desenvolver um método analítico com a finalidade de otimizar o processo de extração e garantir adequadamente a identificação e quantificação dos alcaloides anonaína, normuciferina, glaziovina, norglaucina e glaucina com ajuda de ferramentas quimiométricas.

Metodologia:

O material botânico utilizado na pesquisa (amostras de folhas de *U. duckei*) foram cedidas pelo pesquisador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e são oriundas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Km 26 da rodovia AM-010). Este material foi seco em estufa de circulação de ar à 40°C durante dois dias, sendo, em seguida, trituradas em moinho de quatro facas.

Enumerou-se 23 frascos onde pesaram-se aleatoriamente cerca de 1 g de amostra triturada. Estas amostras permaneceram em processo de extração em 20 mL das soluções extratoras por 48 horas sendo que cada uma foi anteriormente submetida a banho ultrassônico por 15 minutos. A secagem deu-se por meio de gás inerte N₂ e as massas dos extratos secos foram tabelados. A partir destes extratos preparou-se 23 soluções metanólicas (1 mg/mL) que foram filtradas em filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, 0,45 µm) e transferidas para frascos pequenos sendo, em seguida, armazenadas em geladeira a 5 °C para posterior análise.

As análises exploratórias iniciais foram realizadas em um sistema UHPLC-MS A6550 iFunnelTM (Agilent), consistindo de um cromatógrafo líquido de ultra alta performance, um espectrômetro de massas de alta resolução com uma fonte de ESI operando no modo positivo de polaridade. O espectrômetro utilizado possui geometria do tipo quadrupolo-tempo-de-voo (Q-TOF). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna de sílica fase reversa (C18, Poroshell 120EC-C18, 4.6 mm x 50 mm, 2.7 µm) e acetonitrila como fase móvel.

As análises quantitativas foram realizadas em um sistema 8040 de UHPLC-MS/MS da Shimadzu (1040) constituído de um cromatógrafo de ultra-alta performance e um espectrômetro de massas com geometria do tipo triplo-quadrupolo (QqQ). A técnica de ionização foi a ESI e os parâmetros de ionização adaptados das análises exploratórias. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna C18 Shimpack (2.0 mm x 50 mm, 2.2 µm). Foram utilizados os solventes água (Milli-Q) e acetonitrila grau HPLC para as separações. As identificações foram realizadas por meio da comparação com padrões puros dos alcaloides de interesse. Tanto as análises exploratórias quanto as quantitativas foram feitas no laboratório Thomson de espectrometria de massas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a coordenação do Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

Resultados e Discussão:

Os dados experimentais obtidos por meio da melhor solução extratora, determinada pelo planejamento Simplex-Centróide (Figura 1), foram tabelados e submetidos a tratamento estatístico. Buscou-se tratar os dados em termos de rendimento dos extratos e das áreas dos picos cromatográficos dos analitos de interesse. Para ambos testou-se os modelos linear, quadrático e cúbico especial. A ANOVA foi utilizada para avaliar a significância estatística e a falta de ajuste na validação dos modelos.

O melhor rendimento (6,9%) foi obtido pela solução extratora metanol/clorofórmio (1:1, v/v). A ANOVA indicou que todos os modelos testados para os dados de rendimento apresentaram falta de significância estatística a nível de 95% de confiança. Em relação aos picos cromatográficos observou-se de forma geral que a solução extratora metanol/clorofórmio (1:1, v/v) apresentou a melhor capacidade de extração sendo mais intenso para a extração da norglaucina e glaucina.

Anonaína. Para este analito a ANOVA indicou falta de ajuste a nível de 95% de confiança para todos os modelos testados. **Glaziovina.** Para este analito a ANOVA não indicou falta de ajuste ou falta de significância estatística. Escolheu-se o modelo cúbico especial devido à significância de um termo de interação ternário. O valor teórico de 56,6 obtido pelo modelo é condizente com o valor experimental 58,91 e a superfície de resposta do modelo (Figura 2, A) indica a mistura binária metanol/clorofórmio como a de melhor capacidade extratora de glaziovina em folhas de *U. duckei*. **Nornuciferina.** Para este analito a ANOVA não indicou falta de ajuste ou falta de significância estatística para os modelos testados. Escolheu-se o modelo cúbico especial devido à significância de alguns termos de interação ternário. O valor teórico de 439,85 obtido pelo modelo é condizente com o valor experimental 464,90 e a superfície de resposta do modelo (Figura 2, B) indica a mistura binária metanol/clorofórmio como a de melhor capacidade extratora de nornuciferina em folhas de *U. duckei* e na falta de clorofórmio pode-se alternativamente utilizar uma mistura binária metanol/acetona. **Norglaucina.** Para este analito a ANOVA não indicou falta de ajuste ou falta de significância estatística. Escolheu-se o modelo cúbico especial devido à significância de um termo de interação ternário. Para este analito o valor teórico de 555,08 obtido pelo modelo é condizente com o valor experimental 570,7 e a superfície de resposta do modelo (Figura 2, C) indica a mistura binária metanol/clorofórmio como a de melhor capacidade extratora

de norglaucina em folhas de *U. duckei*. **Glaucina.** Para este analito a ANOVA não indicou falta de ajuste ou falta de significância estatística. Escolheu-se o modelo cúbico especial devido à significância de dois termos de interação ternário. O valor teórico de 1811,08 obtido pelo modelo é condizente com o valor experimental 1836,91. A superfície de resposta do modelo (Figura 2, D) indica a mistura binária metanol/clorofórmio como a de melhor capacidade extratora de glaucina em folhas de *U. duckei* e na falta e clorofórmio pode-se alternativamente utilizar uma mistura binária metanol/acetona (1:1).

Trabalhou-se a validação do método em termos de seletividade, linearidade, limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ), precisão e exatidão (DE ARAGÃO et al., 2009). **Seletividade.** A seletividade foi assegurada pelo modo de monitoramento seletivo de reação (SRM, do inglês, *selected reaction monitoring*) do espectrômetro de massa (Figura 3). Esta forma de operação permite que diferentes analitos sejam precisamente quantificados, uma vez que a resposta da detecção não sofre interferência de efeito de supressão iônica ou simplesmente efeito de matriz (WAKSMUNDZKA-HAJNOS & SHERMA, 2011). **Linearidade.** A linearidade foi avaliada em termos da curva analítica com seis níveis de concentração (10, 25, 50, 250, 500 e 1000 ng/L) preparadas em metanol, dispersão de resíduos estáticos e determinação da faixa linear (MILLER & MILLER, 2010). **Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ).** Para cada alcaloide de interesse os valores de LOD e LOQ foram avaliados segundo os parâmetros da curva analítica. A variação do LoD foi de 0,5 a 5,2 ng/L a variação do LoQ foi de 1,6 a 17,2 ng/L. **Precisão e exatidão.** A precisão e exatidão do método foram avaliadas concomitantemente ao ensaio da linearidade através do coeficiente de variação (CV) das áreas médias dos picos cromatográficos e do percentual de recuperação a nível de baixa (50 ng/L), média (500 ng/L) e alta (1000 ng/L) concentração.

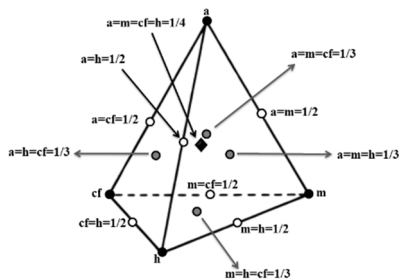


Figura 1. Planejamento simplex-centróide utilizando 4 solventes: metanol (m), clorofórmio (cf), acetona (a) e n-hexano (h).

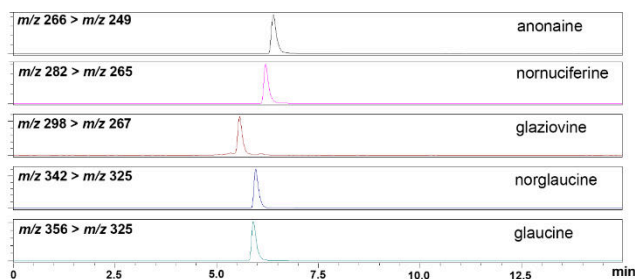


Figura 1. Cromatogramas em modo SRM obtidos usando a solução extratora metanol/clorofórmio (1:1, v/v) no intervalo de tempo de retenção de 4,5 a 7,5 min.

Conclusões:

Desenvolveu-se e validou-se uma metodologia analítica para otimização da extração, identificação e quantificação de alcaloides aporfínicos (anonaína, nornuciferina, glaziovina, norglaucina e glaucina) de folhas de *U. dukei*. O planejamento simplex-centróide indicou a solução binária metanol/clorofórmio (1:1) como a de melhor capacidade extratora. Os dados experimentais foram submetidos a tratamento estatístico e o resultado final de quantificação do método em termos de micrograma de analito por grama de folhas de *U. duckei* foi de: glaziovina (131,10 µg/g), norglaucina (40,57 µg/g), glaucina (23,69 µg/g), anonaína (6,79 µg/g), nornuciferina (< LoQ).

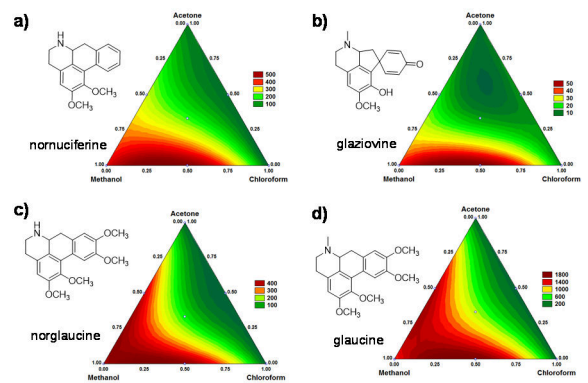


Figura 2. Curvas de superfície de resposta para a) nornuciferina, b) glaziovina, c) norglaucina e d) glaucina. Estas superfícies são em função de metanol, clorofórmio e acetona.

Referências bibliográficas

- CHENG P**, MA Y, YAO S, ZHANG Q, WANG E, YAN M, ZHANG X, ZHANG F, CHEN J. 2007. Two new alkaloids and active anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**: 5316-5320.
- DEHGHAN E**, Hosseini B, Badi NH, Ahmadi SF. 2010. Application of conventional and new biotechnological approaches for improving of morphinane alkaloids production. *J Med Plants* **9**: 33-50.
- DE ARAGÃO NM**, VELOSO MCC, DE ANDRADE, JB. Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "química verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quim. Nova* **2009**, 32(9), 2476-2481.
- JOVEL EM**, CABANILLAS J, TOWERS JHN. 1996. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Miraflores, Loreto, Peru. *J Ethnopharmacol* **53**: 149-156.
- MAAS PJM**, WESTRA LYT, VERMEER M. 2007. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). *Blumea* **52**: 413-554.
- MILLER JN**, MILLER JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education Limited. 6th ed. 2010.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS M**, SHERMA J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Boca Raton: CRC Press, Francis and Taylor.
- SILVA FMA**, SOUZA ADL, KOOLEN HHF, BARISON A, VEMDRAMIN ME, COSTA EV, FERREIRA AG, PINHEIRO MLB. 2014. Phytochemical study of the alkaloidal fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. guided by electrospray ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. *Phytochem Analysis* **25**: 45-49.
- SILVA FMA**, Silva-Filho FA, LIMA BR, ALMEIDA RA, SOARES ER, KOOLEN HHF, SOUZA ADL, PINHEIRO MLB. 2016. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. *J Braz Chem Soc* **27**: 599-604.
- SOARES PK**, BRUNS RE, SCARMINIO IS. 2009. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Journal of Separation Science* **32**: 644-652.