

INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS
DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E MÉTODOS DA
METABOLÔMICA

HELEN SANT' ANA DOS SANTOS RIBEIRO FREITAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

11 DE SETEMBRO DE 2019

**INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS
DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E MÉTODOS DA
METABOLÔMICA**

HELEN SANT' ANA DOS SANTOS RIBEIRO FREITAS

Tese de Doutorado apresentado ao
Centro de Ciência e Tecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, de acordo com as
exigências do Programa de Pós-
graduação em Ciências Naturais
para a obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: PROF. DR JAN SCHRIPSEMA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

11 DE SETEMBRO DE 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R484	<p>Ribeiro, Helen Santana dos Santos.</p> <p>Investigação da qualidade de medicamentos através da ressonância magnética nuclear e de métodos da metabolômica / Helen Santana dos Santos Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.</p> <p>192 f. Bibliografia: 185 - 191.</p> <p>Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2019. Orientador: Jan Schripsema.</p> <p>1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear . 2. Metabolômica. 3. Medicamentos. 4. Similaridade. 5. Solventes eutéticos Naturais Profundos (NADES). I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.</p> <p>CDD - 500</p>
------	---

INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E MÉTODOS DA METABOLÔMICA

HELEN SANT'ANA DOS SANTOS RIBEIRO FREITAS

Tese de Doutorado apresentado ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, de acordo com as exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais para a obtenção do título de Doutor.

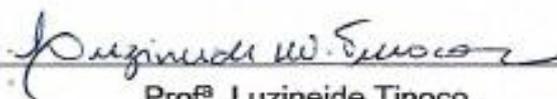
Aprovado em 11 de setembro de 2019.

Comissão Examinadora:



Prof^a. Denise Saraiva Dagnino

(Dr^a em Ciências Matemáticas e da Natureza) - UENF



Prof^a. Luzineide Tinoco

(Dr^a em Química) - UFRJ



Seldon Aleixo

(Dr. em Produção Vegetal) - UENF



Prof. Jan Schripsema

(Dr. em Ciências Matemáticas e da Natureza) - UENF

(Orientador)

Dedico este trabalho a minha querida avó Maria.

AGRADECIMENTOS

- A Deus primeiramente;
- Aos meus pais Helênio e Míriam e aos meus irmãos Helênio Júnior e Helena pelo apoio e compreensão pela minha ausência em alguns momentos;
- Ao meu marido Vitor pelo apoio incondicional na minha acadêmica desde o período da graduação. Também pelo suporte e por compartilhar comigo a experiência de morar na Holanda durante o estágio;
- Ao meu orientador o Prof. Dr Jan Schripsema pela paciência e disponibilidade em me orientar. Um grande pesquisador que serve de inspiração para muitos alunos de doutorado. Agradeço também por acreditar em mim e me apoiar na candidatura ao estágio na Holanda;
- Ao professor Dr. Young Hae Choi por ter me recebido em seu grupo de pesquisa metabólica na Universidade de Leiden na Holanda;
- A todos os professores que participaram das bancas. A Dr. Denise Dagnino pelas medidas de cromatografia;
- Aos meus queridos amigos do grupo metabólica Sônia, Junio, Seldon e Thais pelas discussões e bons momentos no laboratório;
- Aos amigos Queitilane e Marcelo pela ajuda de forma indireta e também os amigos Lilian e Luis pela ajuda e suporte durante o estágio na Holanda;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1.....	xi
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2.....	xii
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 3.....	xiv
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1	xvi
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2	xvii
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 3	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO 1	xxii
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H) COMO MÉTODO RÁPIDO PARA A INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS.....	xxii
RESUMO DO PRIMEIRO CAPÍTULO.....	23
1.1 INTRODUÇÃO	24
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.2.1 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	25
1.2.2. ASPECTOS QUANTITATIVOS DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN-q).....	28
1.2.3 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS DADOS PARA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR QUANTITATIVA (RMN-q)	33
1.2.4 UMA BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS ARTIGOS DE REVISÃO SOBRE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) EM ANÁLISE DE MEDICAMENTOS.....	36
1.2.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) COMO TÉCNICA PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS.....	42
1.3 OBJETIVOS	45
1.4 METODOLOGIA.....	45
1.4.1 METODOLOGIA DE PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	45
1.4.2 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	48

1.4.3 CÁLCULOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS INGREDIENTES ATIVOS DAS AMOSTRAS DOS MEDICAMENTOS.....	48
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
1.5.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	50
1.5.2 CÁLCULOS DE SIMILARIDADE PARA O MEDICAMENTO CLORIDRATO DE SERTRALINA	69
1.6 CONCLUSÕES	71
1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
.....	76
CAPÍTULO 2- VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO <i>PASSIFLORA</i> ATRAVÉS DA ANÁLISE METABOLÔMICA E CÁLCULOS DE SIMILARIDADE.....	76
RESUMO SEGUNDO CAPÍTULO.....	77
2.1 INTRODUÇÃO	78
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	78
2.2.1 METABOLÔMICA UMA VISÃO GERAL	78
2.2.2 ETAPAS NO ESTUDO DA METABOLÔMICA.....	82
2.2.3 ANÁLISES DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	86
2.2.4 O GÊNERO <i>PASSIFLORA</i>	88
2.2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	94
2.2.6 SIMILARIDADE PARA COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS	97
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	99
2.3.1 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS PARA A ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	100
2.3.1.1 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	102
2.3.1.2 PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN- ¹ H PARA A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS.....	102
2.3.1.3 PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN- ¹ H PARA OS CÁLCULOS DE SIMILARIDADE	102
2.3.2 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS PARA A ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	103
2.3.3 CÁLCULOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES PRESENTES NOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO <i>PASSIFLORA</i> ...	104

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
2.4.1 DETECÇÃO DOS FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	105
2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	113
2.4.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	119
2.4.4 CÁLCULOS DE SIMILARIDADE.....	121
.....	121
2.4.5 ESPECTROS DIFERENCIAIS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HDROGÊNIO (RMN- ¹ H)	122
2.5 CONCLUSÕES	132
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
CAPÍTULO 3 - MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO <i>PASSIFLORA</i> COM SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS (NADES) PARA TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE.....	
RESUMO TERCEIRO CAPÍTULO	137
3.1 INTRODUÇÃO	139
3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	140
3.2.1 SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS (NADES).....	140
3.2.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPTLC).....	142
3.2.3 ENZIMA TIROSINASE	150
3.3 OBJETIVOS	154
3.4 METODOLOGIA.....	155
3.4.1 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO <i>PASSIFLORA</i> PARA A EXTRAÇÃO COM SOLVENTES NADES.....	155
3.4.1.1 Metodologia de preparo dos Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES).....	155
3.4.1.2 Metodologia de preparo dos extratos dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> por solventes NADES e metanol.....	157
3.4.1.3 Preparo das soluções de referência dos flavonoides.....	159
3.4.1.4 Preparo das soluções para o teste de inibição da enzima tirosinase	159
.....	159
3.4.1.5 Metodologia da análise em cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).....	160

3.4.1.6 Ensaio autobiográfico de inibição da enzima tirosinase em amostras de medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i>	161
3.4.1.7 Impressão digital da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> e ensaio de inibição da enzima tirosinase.....	162
3.4.1.8 Análise de extratos de solventes NADES com 10 % de água e metanol.....	162
3.4.1.9 Análise do Solvente Eutéticos Natural Profundo (NADES) 6 com diferentes teores de água e ensaio de inibição da enzima tirosinase.....	163
3.4.1.10 Isolamento da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> por cromatografia líquida preparativa.....	164
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	168
3.5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPTLC).....	168
3.5.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL (RMN – 2D)	179
3.6 CONCLUSÕES	185
3.7 REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186
APÊNDICE I.....	193

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1- Orientação dos spins na ausência de um campo magnético e na presença de um campo magnético aplicado (BRUICE, 2006).	26
Figura 2 - Aquisição de um espectro de RMN.....	27
Figura 3 – Relação entre a relaxação longitudinal (T_1) e a relaxação transversal (T_2) (SILVERSTEIN, 1963).....	34
Figura 4 – Sequência de pulso padrão para um experimento de RMN- ^1H (SILVERSTEIN, 1963).....	34
Figura 5 - Variedade de amostras e aplicações da RMN quantitativa de hidrogênio adaptado de SIMMLER, 2014.	43
Figura 6 - Estruturas químicas para sertralina, alprazolam e vitamina D_3 , quinapril, enalapril e paracetamol.....	44
Figura - 7 - Esquema do protocolo de análise e extração da metabolômica, adaptado (SCHRIPSEMA et al, 2018).....	46
Figura 8 - Espectro de RMN- ^1H do medicamento do cloridrato de sertralina em CDCl_3 . P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do cloridrato de sertralina... 52	52
Figura 9 - a) Espectro de RMN- ^1H do medicamento de alprazolam em CDCl_3 e b) região de ampliação de 7-8 ppm. Numeração não corresponde com estrutura. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do alprazolam.	54
Figura 10 - Espectro RMN- ^1H do medicamento de vitamina D_3 em CDCl_3 e b) região de ampliação de 2,5-6,5 ppm. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado da vitamina D_3	57
Figura 11 – a) Espectro de RMN- ^1H do medicamento quinapril em D_2O e em b) região de ampliação de 3,0-3,5 ppm. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do quinapril.....	60
Figura 12 – a) Espectro RMN- ^1H dos medicamentos do maleato de enalapril em D_2O e b) região de ampliação 2-4,5 ppm (completa) .P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do maleato de enalapril.	63
Figura 13 - Espectro de RMN- ^1H do medicamento do paracetamol DMSO-d_6 .P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do paracetamol.....	65

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

Figura 1 - Esquema da hierarquia ômicas: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica.	79
Figura 2- Esquema de representação dos experimentos típicos em metabolômica (SCHRIPSEMA, 2015).	81
Figura 3 - Representação do esqueleto das classes de flavonoides (VILLIERS et al., 2016).	92
Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.	92
Figura 5- Esquema de representação geral de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).	95
Figura 6 – Fórmula para o cálculo de similaridade.	97
Figura 7- Esquema do protocolo de análise e extração das amostras (SCHRIPSEMA et al, 2018).	101
Figura 8- Amostras contendo <i>Passiflora</i> analisadas por RMN.	101
Figura 9 – Medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> analisados por HPLC.	104
Figura 10 – Cromatogramas dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> sem a presença dos flavonoides investigados, em a) e b) possíveis flavonoides presentes na amostra.	107
Figura 11 – Cromatogramas das amostras de medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> com a presença de flavonoides e em a) o espectro de UV da isovitexina, em b) da vitexina e em c) da isoorientina.	108
Figura 12 – Espectro dos padrões de flavonoides em a) isovitexina, b) vitexina, c) isoorientina e d) orientina.	110
Figura 13 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹ H) dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> em CD ₃ OD e em a) região de 6,5-8,5 ppm ampliada	114
Figura 14 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹ H) dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> em CD ₃ OD com os respectivos sinais identificados da isovitexina e da vitexina.	115
Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹ H) da piridina em CD ₃ OD.	117
Figura 16 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos metanólicos analisados por RMN- ¹ H dos onze medicamentos contendo <i>Passiflora</i> na região de 1-10 ppm.	120
Figura 17 - Score Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos metanólicos analisados por RMN- ¹ H dos onze medicamentos contendo de <i>Passiflora</i> da região de 1,0 – 10,0 ppm.	120
.....	120
Figura 18 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos P1 e P4, em a) a ampliação da região aromática (6,5-8,0 ppm).	123

Figura 19 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos P2 e P4, em a) ampliação da região de 2,0-4,5 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	124
Figura 20 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos P3 e P6. Em a) ampliação da região de 2,0-4,5 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	125
Figura 21 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos P5 e P6. Em a) ampliação da região de 1,0-5,0 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	126
Figura 22 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos PO e P6. Em a) ampliação da região de 0,0-5,0 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	127
Figura 23– Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos P5 e PR. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	128
Figura 24 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos PE e PS. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	129
.....	129
Figura 25 – Espectro diferencial de RMN- ¹ H dos medicamentos PK e PS. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.	130

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 3

Figura 1 - Ilustração da composição dos solventes eutéticos naturais profundos (NADES) adaptado de DAÍ et al., 2013.	141
Figura 2 - Esquema de análise de amostra na cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).	147
Figura 3 – Biossíntese da melanina (ADAPTADO de CHANG et al., 2009)...	151
Figura 4- Exemplo de um ensaio autobiográfico para a inibição da enzima tirosinase usando HPLTC (TAIBON et al., 2015).	153
Figura 5 – Solventes NADES 1, 2, 3,4, 5 e 6.	156
Figura 6 – Extratos dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> com solventes NADES 1, 2, 3,4, 5 e 6.	157
Figura 7 - Protocolo de extração dos compostos presentes na planta (DAÍ et al., 2013 e LIU et al., 2017).	158
Figura 8 - Esquema da metodologia usada na cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).	160
Figura 9(a) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.	165
Figura 9(b) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.	166
Figura 9(c) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.	166
Figura 10. Impressão digital dos extratos metanólico das onze amostras de medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> P2, PO, PK, P3, P4, PR, P1, P6, P5, PE e PS obtidos por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).	168
Figura 11 - Ensaio de inibição autobiográfico da enzima tirosinase usando placas de HPTLC e as amostras dos medicamentos dos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> P2, PO, PK, P3, P4, PR, P1, P6, P5, PE e PS e dos compostos em a) ácido benzoico e b) ácido L-ascórbico.	169
Figura 12 – Impressão digital dos a) extratos metanólicos em triplicata da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2 e padrões de flavonoides b) isorientina, c) isovitexina, d) vitexina e e) orientina por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).	170
Figura 13 - Ensaio de inibição autobiográfico da enzima tirosinase usando placas de HPTLC obtido com extrato metanólico em triplicata da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2 e os padrões de flavonoides b) isorientina, c) isovitexina, d) vitexina e e) orientina.	171
Figura 14 – Impressão digital de cada um dos seis extratos NADES em a) NADES 1, b) NADES 2, c) NADES 3, d) NADES 4, e) NADES 5, f) NADES 6 e g) extrato metanólico obtidos em triplicata com da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2 por HPTLC.	172

Figura 15 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos NADES 1,2,3,4,5 e 6 e do extrato metanólico.....	173
Figura 16 –Impressão digital do a) extrato de metanólico e do extrato em b) NADES 1, c) NADES 2, d) NADES 3, e) NADES 4, f) NADES 5 e g) NADES 6 da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2 usando HPTLC.	174
Figura 17 - Ensaio de inibição autobiográfico de inibição da enzima tirosinase utilizando o HPTLC dos extratos a) NADES 1, b) NADES 2, c) NADES 3, d) NADES 4, e) NADES 5, f) NADES 6 e g) do extrato de metanólico e dos padrões h) ácido benzoico e i) ácido L-ascórbico	175
Figura 18 - Extratos a) metanólicos e com o solvente NADES 6 com diferentes concentrações de água b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e f) 20 % de água da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> usando HPLTC.	176
Figura 19 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos NADES 6 com diferentes quantidades de água (0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 %).	177
Figura 20 - Perfil dos extratos em a) metanólico e dos extratos do NADES 6 com diferentes quantidades de água em b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e em f) 20 % de água da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> usando HPTLC.	178
Figura 21 - Ensaio de inibição autobiográfico de inibição da enzima tirosinase utilizando o HPTLC a partir dos extratos em a) metanólico e com o NADES 6 com diferentes concentrações de água em b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e em f) 20 % de água	178
Figura 22 –Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹ H) do composto isolado do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2 em DMSO-d ₆	179
Figura 23 – Espectro de ressonância magnética heteronuclear ¹ H- ¹³ C (HMBC) do flavonoide inibidor da tirosinase isolado do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2.	181
Figura 24 – Espectro de ressonância magnética heteronuclear ¹ H- ¹³ C (HSQC) do composto inibidor da tirosinase isolado da amostra do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2.	182

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Medicamentos, solventes, padrões internos e quantidade detectada em alguns artigos de revisão.....	40
Tabela 2 - Medicamentos analisados, quantidade pesada, solvente e padrão interno usado na sua metodologia de preparo.	47
Tabela 3 - Solventes deuterados listados em ordem de polaridade usados em RMN e os seus respectivos preços.	50
Tabela 4 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H para o medicamento contendo cloridrato de sertralina em CDCl ₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (SALSBURY et al., 2005).	52
Tabela 5 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos por RMN- ¹ H para o medicamento de cloridrato de sertralina analisado.	53
Tabela 6- Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H-para o medicamento contendo alprazolam em CDCl ₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (SAFARAZ et al., 2014 e MASSAH et al., 2016).	55
Tabela 7 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de alprazolam analisados por RMN- ¹ H.	56
Tabela 8 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H para o medicamento contendo vitamina D ₃ em CDCl ₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (HELMER et al., 1985).....	58
Tabela 9 - Quantidade detectada do ingrediente ativo do medicamento da vitamina D ₃ analisada por RMN- ¹ H.	59
Tabela 10- Deslocamentos químicos para o espectro de RMN- ¹ H do medicamento contendo quinapril em D ₂ O em comparação com aqueles relatados na literatura (SHEN et al., 2015).	61
Tabela 11 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos quinapril analisado.	61
Tabela 12 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H para os medicamentos contendo maleato de enalapril em D ₂ O em comparação com aqueles relatados na literatura (ALI et al., 2006).....	64
Tabela 13 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de maleato de enalapril analisado.....	64
Tabela 14 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H para os medicamentos contendo paracetamol em DMSO-d ₆ em comparação com aqueles relatados na literatura (SANTOS et al., 2013).	66
Tabela 15 – Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de paracetamol analisado.	66
Tabela 16 – Comparação das quantidades detectadas dos ingredientes ativos do medicamento de maleato analisado em quadruplicata.	68
Tabela 17- Tabela de similaridade das amostras de cloridrato de sertralina a partir do método de <i>floating bins</i>	70

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela1 – Flavonoides presentes nas espécies de <i>Passiflora</i> que foram relatados na literatura como compostos marcadores das diferentes espécies (WOSCH et al., 2017).	91
Tabela 2 – Flavonoides relatados na literatura que estavam presentes em <i>P. incarnata</i> (MARCHART et al., 2003, FARAG et al., 2016 e GADIOLI et al., 2018).	93
Tabela 3 – Composição dos extratos das plantas presentes nos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> analisados.....	99
Tabela 4- Tempos de retenção (Tr) e comprimento de onda máximo (λ) característicos dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina. 111	
Tabela 5- Medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> analisados e os respectivos flavonoides identificados com os seus tempos de retenção (Tr) e comprimentos de onda (λ) absorvidos.	111
Tabela 6 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ¹ H para os medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i> em comparação com aqueles relatados na literatura (FARAG et al., 2016) em metanol deuterado.....	116
Tabela 7 - Quantidade detectada de vitexina por RMN- ¹ H para os medicamentos contendo <i>Passiflora</i> analisados.....	118
Tabela 8 -Quantidade detectada de isovitexina por RMN- ¹ H para os medicamentos contendo <i>Passiflora</i> analisados.....	118
Tabela 9– Tabela de similaridade dos medicamentos contendo <i>Passiflora</i> a partir do método de <i>floating bins</i>	121
Tabela 10 – Picos em comum identificados nos espectros diferenciais dos medicamentos fitoterápicos contendo <i>Passiflora</i>	131

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Características das placas de TLC e HPTLC (POOLE, 2011).	143
Tabela 2- Comparação entre TLC e HPTLC (ANDOLA, 2010).	144
Tabela 3 - Composição e razão molar usada dos NADES.....	156
Tabela 4 - Dados de HMBC do flavonoide inibidor da tirosinase isolado do medicamento fitoterápico contendo <i>Passiflora</i> P2.....	181
Tabela 5- Deslocamentos químicos de carbono do composto inibidor da enzima tirosinase em comparação com os valores de deslocamento químico relatados na literatura (AGRAWAL, 1989).	183

RESUMO

Esta tese está dividida em três capítulos e teve como objetivo a verificação da qualidade de medicamentos. No primeiro capítulo encontram-se os resultados das análises de seis medicamentos diferentes, cloridrato de sertralina, alprazolam, vitamina D₃, quinapril, maleato de enalapril e paracetamol que foram analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) através da extração direta com solvente deuterado. A quantidade pesada, o volume do solvente usado e o sinal de RMN de ¹H apropriado para a quantificação foram escolhidos para cada medicamento o que permitiu a quantificação de todos, logo, o método proposto mostrou-se eficiente para uma verificação rápida da qualidade dos mesmos sem a necessidade de desenvolver uma metodologia específica ou realizar análises de RMN quantitativo. No segundo capítulo encontram-se os resultados das análises de onze medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* analisados através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a obtenção da sua impressão digital e através da RMN para a quantificação dos flavonoides comumente presentes no gênero *Passiflora*, vitexina e isovitexina. Estes dois compostos foram identificados em apenas 5 fitoterápicos em quantidades inferiores aos sugeridos nos seus rótulos. Uma divisão em duas classes químicas distintas foi observada através das análises dos componentes principais (PCA) e dos cálculos de similaridade. As diferenças nos espectros foram observadas através da espectroscopia diferencial e verificamos que não há uma padronização na sua composição. No terceiro capítulo encontram-se os resultados do teste de atividade para a inibição da enzima tirosinase realizados com os medicamentos fitoterápicos analisados no segundo capítulo. Foram realizadas extrações dos flavonoides com seis solventes eutéticos naturais profundos (NADES) e o perfil de extração foi classificado em dois grupos distintos pela análise de PCA. Os extratos NADES apresentaram quatro flavonoides inibidores da enzima tirosinase e um composto ativador da enzima. Então o NADES número 6 foi escolhido para realizar experimentos com adição de água e observou-se que a partir de 10% a eficiência da extração foi aumentada. O flavonoide com maior atividade de inibição da enzima foi isolado e identificado como isovitexina-2"-O-β-glucosídeo. Assim,

nesta tese verificamos a qualidade dos medicamentos comuns e dos medicamentos fitoterápicos por RMN e por métodos da metabolômica. Além disso, foram realizados testes biológicos para a investigação de novos inibidores da enzima tirosinase.

Palavras-chave: RMN, metabolômica e medicamentos

ABSTRACT

This thesis is divided in three different chapters and the objective was the verification of quality of drugs. In the first chapter are shown the results of measurements realized with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) as a rapid method for the investigation of drug quality. Six different drugs, sertraline hydrochloride, alprazolam, vitamin D₃, quinapril, enalapril maleate and paracetamol were analyzed through direct extraction with deuterated solvent. The appropriate weights, volume of solvent and adequate NMR signal were chosen for each drug tested. The proposed method allowed the quantification of all drugs and it was efficient for a rapid verification of the drug without the necessity to develop a specific methodology. In the second chapter results are shown of the verification of *Passiflora* herbal medicines by metabolomics analysis and similarity. Eleven *Passiflora* samples were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) and NMR to obtain the metabolic fingerprints. The markers compounds, vitexin and isovitexin were quantified by NMR and their quantities could be determined in five *Passiflora* samples. The *Passiflora* herbal medicines were divided into two distinct chemical groups by principal component analysis (PCA) and similarity calculations. The differences in all NMR spectra were verified by differential spectroscopy and it was observed that there is no standardization in its composition. In the third chapter were analysed the same herbal medicines used in chapter two, but they were extracted with six different NADES (Natural Deep Eutectic Solvents). The extraction profile all of them was classified into two different chemical groups by PCA. In the *Passiflora* extracts four tyrosinase enzyme inhibitors were detected. NADES 6 was chosen to perform experiments adding different percentages of water and the extraction efficiency was improved with 10 % of water. The major active flavonoid was isolated and identified as isovitexin-2''-O-β-glucoside. Thus, in this thesis we verified the drug quality of two different classes of drugs, common drugs and herbal medicines by NMR and metabolomics method. In addition, biological tests was done with *Passiflora* herbal medicines to investigate new tyrosinase inhibitors.

Keywords: NMR, metabolomics and drugs

CAPÍTULO 1

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H) COMO MÉTODO RÁPIDO PARA A INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

RESUMO DO PRIMEIRO CAPÍTULO

A análise dos ingredientes ativos de um medicamento pode ser realizada através da RMN, pois só é necessária à sua solubilização e extração com um solvente deuterado adequado. A presença do ingrediente ativo no medicamento na quantidade correta é o primeiro passo para excluir a possibilidade de falsificação. O objetivo deste trabalho foi demonstrar que a RMN serve como um método rápido de verificação da quantidade de um ingrediente ativo através da extração direta dos seus ingredientes ativos com o solvente deuterado apropriado sem a necessidade de desenvolver uma metodologia específica. Seis diferentes medicamentos amplamente usados foram analisados: cloridrato de sertralina, alprazolam, vitamina D₃, quinapril, maleato de enalapril e paracetamol. O cloridrato de sertralina, o alprazolam e a vitamina D₃ foram extraídos com clorofórmio (CDCl₃-d₆), enquanto que o quinapril e o maleato de enalapril foram extraídos com água deuterada (D₂O) e o paracetamol com dimetilsulfoxido (DMSO-d₆). As análises mostravam que foi possível identificar e quantificar os ingredientes ativos de maneira rápida e eficiente. A quantificação foi feita através da integração dos sinais isolados dos compostos no espectro de RMN e comparação com os sinais do padrão interno apropriado. Foi mostrado que a quantificação é reproduzível e suficientemente precisa para testar os medicamentos. A precisão do método foi testada com o maleato de enalapril através de réplicas o que mostrou pequenas variações nas quantidades detectadas. A similaridade dos medicamentos de cloridrato de sertralina foi avaliada, pois era o medicamento com o maior número de marcas analisados e verificamos que a sua composição química foi similar entre 85-94 %, diferenciando-se apenas na composição de alguns dos seus excipientes que variavam de acordo com as marcas. Deste modo, com o método proposto foi possível fazer uma estimativa da quantidade dos ingredientes ativos em seis medicamentos analisados sem a necessidade de desenvolver uma metodologia específica ou usar RMN quantitativa.

Palavras-chave: RMN, ingrediente ativo e falsificação

1.1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos são produtos farmacêuticos de grande importância, pois eles tratam os sintomas e podem proporcionar a cura para doenças. Devido a possibilidade de falsificação ou adulteração dos medicamentos, mecanismos de controle devem estar presentes. Para começar será necessário confirmar a presença dos ingredientes ativos nas quantidades exigidas. Em relatórios da OMS (Organização Mundial de Saúde) há estimativas que 10 a 15% dos medicamentos vendidos no país são falsificadas ou apresentam problemas de qualidade. Um medicamento pode ser de qualidade inferior e/ou apresentar falsificação. Na falsificação há a intenção de enganar o consumidor. Os problemas que podem ocorrer são (entre outros) os seguintes:

1. Os medicamentos não contem o ingrediente ativo.
2. O ingrediente ativo está presente em quantidades muito abaixo dos níveis necessários.
3. Falsificação do medicamento usando o ingrediente ativo, mas falsificando a embalagem assim fingindo ser da marca registrada.
4. Presença de impurezas que podem interferir com a atividade.
5. Medicamentos incorretamente embalados ou transportados com riscos a qualidade.
6. Falhas na produção ou embalagem levando a produtos contendo quantidades diferentes do ingrediente ativo que indicado na embalagem.

Na literatura nos estudos de falsificação e controle de qualidade dos medicamentos são inicialmente verificados a presença dos ingredientes ativos através da sua confirmação em comparação com padrões dos ingredientes ativos por meio da análise com várias técnicas como espectroscopia ultravioleta e visível (UV-VIS), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia RAMAN e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (HOLZGRABE et al., 2011; SANTOS et al., 2013; TREFI et al., 2008 e GOROG et al., 2015). Estas técnicas são amplamente recomendadas pelas farmacopeias (GOROG et al., 2015), porque estas técnicas geralmente estão mais disponíveis e possuem fácil acesso. No entanto a ressonância magnética nuclear (RMN)

ainda é uma técnica pouco usada para tal finalidade, principalmente pelo alto custo dos equipamentos e conseqüentemente pouca disponibilidade (HOLZGRABE et al., 2011). No entanto a RMN apresenta diversas vantagens tais como permite a análise qualitativa e quantitativa dos compostos presentes em uma amostra de forma simultânea, permite uma fácil preparação da amostra e proporciona uma análise rápida (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015), além de ser usada para a análise de diversas amostras (SHEN, 2015).

Além das vantagens da RMN mencionadas ela permite a verificação da presença ou ausência dos ingredientes ativos e excipientes nos medicamentos (MAGGIO et al., 2014 e JAMES et al., 1995), proporcionado assim a verificação de possíveis falsificações. Assim, um medicamento deve ser analisado a fim de verificar se contém o ingrediente ativo e se ele está na quantidade correta (HOLZGRABE et al., 2011).

Deste modo, a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) foi usada para a detecção da presença dos ingredientes ativos nos medicamentos paracetamol, vitamina D₃, quinapril, maleato de enalapril, cloridrato de sertralina e alprazolam, pois eles estavam disponíveis no mercado e foi fácil a sua aquisição. Assim, para a análise destes medicamentos de uma maneira rápida a RMN de ¹H foi usada, assim a extração e a solubilização dos ingredientes ativos dos respectivos medicamentos foi realizada com um solvente deuterado apropriado o que permitiu a quantificação dos mesmos sem a necessidade de desenvolver e validar uma metodologia de RMN quantitativo.

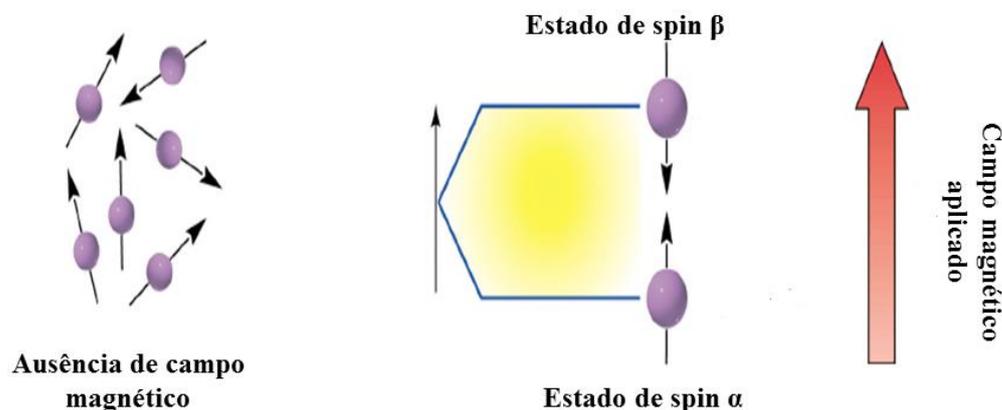
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A RMN foi descoberta na década de 1940 por físico-químicos que estudavam as propriedades de núcleos atômicos. Núcleos possuem estados de spin +1/2 e -1/2 e esta propriedade possibilitou que esses núcleos pudessem ser estudados. Núcleos em movimento angular geram um campo magnético. Na ausência de um campo magnético aplicado, os spins nucleares encontram-se orientados aleatoriamente. No entanto, se uma amostra que contenha esses

núcleos for colocada em um campo magnético aplicado, o núcleo gira e tende a se alinhar a favor ou contra o campo magnético. Os spins que se alinham a favor do campo magnético estão em um estado α , menor energia, e os spins que se alinharam contra o campo magnético estão em um estado β , de maior energia. A diferença de energia entre os dois estados de spins, α e β , depende da força do campo magnético, ou seja, quanto maior a força do campo maior a diferença de energia e vice-versa. Se a amostra for submetida a uma energia igual à diferença de energia (ΔE) entre os dois estados de spins, α e β , há uma transição dos núcleos do estado α para o estado β . A energia necessária para promover esta transição é a radiofrequência (PAIVA, 2010). A ilustração deste processo pode ser visualizada na figura 1.

Figura 1- Orientação dos spins na ausência de um campo magnético e na presença de um campo magnético aplicado (BRUICE, 2006).



O fenômeno chamado de ressonância é então a passagem dos núcleos do estado de spin α para o estado β como resposta a radiação de radiofrequência aplicada na presença de um campo magnético. Segundo BRUICE, 2006:

[...] A equação a seguir mostra que a diferença de energia entre os estados de spin α e β depende da frequência de operação do espectrômetro de RMN ao qual depende da força do campo magnético aplicado (B_0) medida em tesla (T)¹ e da razão giromagnética (γ). A razão giromagnética é uma constante e depende do momento magnético de um núcleo em particular. No caso do próton de hidrogênio o valor de γ é $2,675 \times 10^8 T^{-1}.s^{-1}$ e no caso do núcleo de ¹³C é $6,688 \times 10^7 T^{-1}.s^{-1}$.

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot \gamma}{2\pi} \times B_0$$

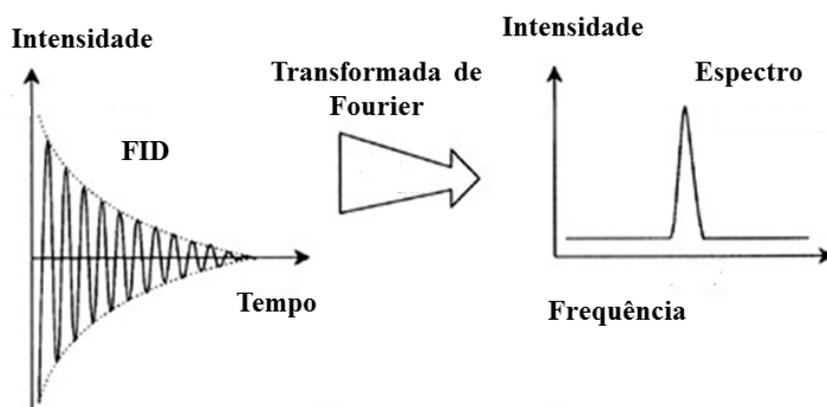
Cancelando a constante de Planck em ambos os lados da equação chegamos a seguinte equação:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} \times B_0$$

[...] essa equação mostra que o campo magnético (B_0) é proporcional a frequência operacional (MHz). Portanto, se o espectrômetro possui um magneto mais poderoso, ele deve ter uma frequência operacional maior. Os espectrômetros de RMN atuais operam em frequências de 60 a 900 MHz. A frequência operacional de um espectrômetro em particular depende da força do magneto construído. Quanto maior é a frequência operacional de um instrumento (e mais forte o magneto), melhor é a resolução do espectro de RMN. (BRUCE, 2006, p.526).

Em RMN pulsada, na presença de um campo magnético constante, todos os núcleos são simultaneamente excitados por um pulso curto da radiação de radiofrequência e assim eles absorvem energia e entram em ressonância. Quando os prótons voltam ao seu estado inicial, eles emitem energia em uma frequência igual ao ΔE , este sinal é chamado de decaimento de indução livre (FID) em uma frequência correspondente ao ΔE . Um computador coleta as informações da intensidade versus tempo e uma operação matemática chamada Transformada de Fourier (FT) transforma estas informações em intensidade versus frequência que produz então um espectro chamado de espectro de Ressonância Magnética Nuclear com Transformada de Fourier (FT-RMN), conforme ilustrado na figura 2 (BRUCE, 2006).

Figura 2 - Aquisição de um espectro de RMN.



Fonte: [http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/en-US/18014398879323275.html)

[US/html/Avance%20Beginners%20Guide/en-US/18014398879323275.html](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/en-US/18014398879323275.html), acessado em 05/11/19.

As posições dos sinais no espectro de RMN são definidas em relação à posição do sinal da substância de referência que geralmente é o Tetrametilsilano (TMS). A posição do sinal em um espectro de RMN é chamada de deslocamento

químico (δ) que é definido como a medida da distância entre o sinal observado e o sinal do TMS. A escala de deslocamento químico é a escala Delta (δ). Que é calculada pela medida da distância do sinal do TMS (em hertz) dividido pela frequência operacional do instrumento (em mega-hertz) de acordo com a fórmula abaixo:

Fórmula: $\delta = \frac{\text{distância em direção ao campo baixo a partir do TMS (Hz)}}{\text{frequência operacional do espectrômetro (MHz)}}$

O valor do deslocamento químico é independente da frequência operacional do equipamento e cada núcleo tem um valor específico de deslocamento químico em um ambiente diferente dentro da mesma molécula, o que possibilita a sua identificação (PAIVA, 2010).

1.2.2. ASPECTOS QUANTITATIVOS DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN-q)

Em RMN-q existem vários métodos para a quantificação de um analito: método do padrão interno, método do padrão externo, método da adição-padrão, método da curva de calibração, método de referência eletrônica (ERETIC) e determinação da concentração no comprimento do pulso (PULCON) entre outros métodos.

No método do padrão interno uma concentração conhecida ou uma quantidade pesada do composto de referência é dissolvido em um volume conhecido da solução do analito para a quantificação. Um padrão interno ideal deve apresentar algumas características, tais como, altamente puro, barato, estável, quimicamente inerte, não volátil, não higroscópico e solúvel na maioria dos solventes usados em RMN (BHARTI et al., 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). Tetra-metil-silano (TMS), 3-(trimetil-sililano) -1-ácido sulfônico propano sal sódico (DSS) e (3-trimetilsilil) - ácido propanoico em sal sódio (TSP) são exemplos de compostos de referência para análise quantitativa e para calibrar o deslocamento químico no espectro, enquanto os compostos ácido málico, álcool terc-butílico, acetato de sódio, maleato de sódio e ácido fórmico, por exemplo podem ser usados como compostos padrão para a quantificação (BHARTI et al., 2012).

Há também o método para o padrão externo neste método uma inserção de um tubo capilar com o composto de referência dissolvido em uma solução de solvente deuterado e este tubo capilar é então inserido no tubo de RMN contendo o analito. A concentração do composto de referência dentro do tubo capilar não é usada diretamente para a quantificação. A concentração efetiva da solução de referência deve ser calibrada com o uso de um padrão primário (uma solução conhecida de qualquer composto). A substância de referência é então colocada em um tubo capilar que é então inserido em um tubo de RMN com a solução do padrão primário. Depois da padronização do padrão externo, o capilar é removido, enxaguado e seco e só então é colocado em um tubo de RMN contendo a solução do analito (BHARTI et al., 2012). O método de quantificação com o padrão externo é uma maneira de evitar a contaminação do analito com a substância de referência devido ao uso do capilar. Existem algumas desvantagens desse método, a saber: a homogeneidade da amostra que se torna difícil, especialmente quando a referência e o analito estão em sistemas de solventes diferentes. A sensibilidade é reduzida devido à existência de uma unidade de volume menor do analito na região da bobina de radiofrequência (BHARTI, 2012).

Os métodos de adição-padrão e curva de calibração também podem ser usados, mas há a exigência de um composto padrão de referência. Neles há a construção de uma curva de calibração usando a regressão linear e a integral dos sinais de RMN. Os valores das integrais são obtidos a partir de uma série de diluições da solução estoque do composto de referência. As amostras que contém o analito são gravadas usando os mesmos parâmetros instrumentais do padrão de referência e a integral obtida é comparada com as integrais da curva de calibração a fim de calcular a concentração do analito. A desvantagem destes métodos é a necessidade de um composto padrão de referência para cada analito que precisa ser quantificado, por exemplo, se 10 analitos precisam ser quantificados em uma mistura, 10 curvas de calibração precisam ser feitas usando os seus respectivos compostos de referência (BHARTI, 2012).

Além dos métodos de quantificação mencionados há o método de referência eletrônica (ERETIC) que consiste na quantificação de um analito usando um sinal eletrônico de referência e pode ser usado por exemplo se não há um padrão interno disponível (BHARTI, 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). O

método ERETIC fornece um sinal falso de FID que possui todas as características de um sinal real de RMN e seus parâmetros como frequência, magnitude e fase podem ser controlados. O sinal ERETIC pode ser calibrado usando uma solução de concentração conhecida seguindo a fórmula (BHARTI, 2012):

$$[\text{ERETIC}] = [\text{REF}] \times \frac{A_{\text{ERETIC}}}{A_{\text{REF}}}$$

Onde: ERETIC= sinal eletrônico gerado, REF= concentração da solução de calibração, A_{ERETIC} = área do pico ERETIC e A_{REF} = área do pico de calibração

Depois da calibração do sinal ERETIC a concentração para qualquer composto pode ser quantificada usando a seguinte expressão:

$$[\text{Comp}] = K \cdot [\text{ERETIC}] \times \frac{A_{\text{Comp}}}{A_{\text{ERETIC}}}$$

Onde: [Comp]= peso molecular do composto e K= número de prótons do pico de interesse.

As sequências de pulso de RMN precisam de uma pequena modificação para gerar o sinal ERETIC. A fase do ERETIC precisa ser ajustada separadamente com um programa de computador. O método ERETIC é uma forma de determinar concentrações absolutas. Um controle total da amplitude, fase do sinal sintético e deslocamento químico permite não apenas a referência de deslocamento químico, mas também uma integral de referência acurada (HOLZGRABE et al., 2010).

A técnica de determinação da concentração baseada no comprimento do pulso (PULCON) foi introduzida como uma técnica para a quantificação de proteínas como uma alternativa ao método ERETIC. O método é baseado na reciprocidade, a intensidade do sinal de RMN é inversamente proporcional a força do pulso de 90° aplicado. Um pulso de radiofrequência de 360° é medido. O sinal de um único próton ou um grupo de sinais com um número conhecido de prótons contribuintes deve ser integrado. O pulso de 360° previamente determinado e a integral da referência pode ser usada para calcular a concentração da amostra da proteína a ser quantificada. Uma vez que foi medida a concentração da amostra de referência centenas de soluções de proteínas podem ser determinadas (HOLZGRABE et al., 2010).

Uma vez que o método de quantificação do analito na amostra foi determinado a sua quantidade pode ser calculada através da quantificação absoluta ou pela quantificação relativa (BHARTI, 2012, HOLZGRABE et al., 2010 e PAULI et al., 2014). A quantificação relativa pode ser feita através da relação entre dois compostos presentes na amostra e pode ser calculada a partir da fórmula a seguir (BHARTI, 2012 e HOLZGRABE et al., 2010).

$$\frac{M_x}{M_y} = \frac{I_x}{I_y} \times \frac{N_y}{N_x}$$

Onde: M_x/M_y = é a razão molar entre os dois compostos, I_x = valor da integral do composto X, I_y = valor da integral do composto Y, N_y = número de hidrogênios de Y e N_x = número de hidrogênios de X.

Já a quantificação absoluta pode ser realizada de duas maneiras distintas, primeiro se todos os compostos presentes nas amostras são conhecidos e suas quantidades também forem conhecidas é só fazer a diferença da quantidade de cada um deles em relação a 100 % (BHARTI, 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). A outra maneira de realizar a quantificação absoluta é através do cálculo da concentração do analito no componente principal da amostra. Este cálculo pode ser realizado conforme a fórmula a seguir (BHARTI, 2012).

$$P_x = \frac{I_{analito}}{I_{padrão}} \times \frac{N_{padrão}}{N_{analito}} \times \frac{M_{analito}}{M_{padrão}} \times \frac{m_{padrão}}{m} \times P_{padrão}$$

Onde: P_x = concentração do analito, $P_{padrão}$ = concentração do padrão, $I_{analito}$ = integral do analito, $I_{padrão}$ = integral do padrão, $N_{padrão}$ = número de hidrogênios do padrão, $N_{analito}$ = número de hidrogênios do analito, $M_{analito}$ = massa molar do analito, $M_{padrão}$ = massa molar do padrão, $m_{padrão}$ = peso do padrão na amostra e $m_{analito}$ = peso do analito na amostra.

Independentemente do modo de quantificação escolhido, quantificação absoluta ou quantificação relativa, as análises de RMN-q só são possíveis se os sinais no espectro estiverem bem separados e alguns fatores físico-químicos contribuem para a resolução e a separação dos sinais, tais como, o solvente, o pH, o uso de reagentes auxiliares e a concentração do analito e da referência. Os solventes são importantes, pois os deslocamentos químicos dos prótons da

amostra dependem dele e o fator que determina a escolha do solvente é a solubilidade do analito no solvente, assim isto torna-se um requisito. O analito deve ser completamente solúvel no solvente e não deve formar suspensão ou precipitar, assim, antes de preparar o analito a sua solubilidade deve ser verificada. As solubilidades podem ser classificadas em moderadamente solúvel (≤ 1 g em 100 ml), solúvel (até 1 g em 30 mL), livremente solúvel (>1 g em 10 mL) ou muito solúvel (>1 g em 1 mL) (BHARTI et al., 2012). Se houver a sobreposição dos sinais do solvente com os sinais do analito às vezes é necessário a mudança do solvente o que pode ser uma saída útil ou outra alternativa é a mistura de solventes (HOLZGRABE et al., 2010).

O pH da amostra também desempenha um papel importante na análise quantitativa e a mudança de pH pode causar um desvio no deslocamento químico do sinal desejado o que pode levar a sobreposição de sinais no espectro (BHARTI et al., 2012), assim soluções com diferentes valores de pH podem ser aplicados para alcançar uma separação ótima dos sinais (HOLZGRABE et al., 2010). Os reagentes auxiliares (ciclo dextrinas e reagentes lantanídeos de deslocamento químico) podem ser usados por exemplo para determinar enantiômeros. Os reagentes lantanídeos possuem um forte centro de anisotropia paramagnética na molécula e podem afetar o deslocamento químico de alguns núcleos da ordem de vários ppm, devido à habilidade de formar complexos com moléculas orgânicas contendo par de íons (HOLZGRABE et al., 2010).

A concentração do analito e da substância de referência devem estar em uma proporção comparável. Se a diferença na concentração do analito e da substância de referência for muito grande causará excesso de informações, resultando na distorção do sinal ou baixa relação sinal/ruído para a substância que estiver em menor concentração. Por outro lado, caso haja alta concentração do analito ou da substância de referência levará a um excesso de sinais e resultará em espectros distorcidos. Durante a integração manual uma ligeira variação da área do sinal mais alto irá causar um erro quantitativo significativo (BHARTI, 2012).

Deste modo, existem diferentes métodos de quantificação de um analito em RMN-q e a escolha do método depende do objetivo da análise. Independentemente do método escolhido os fatores que contribuem para a

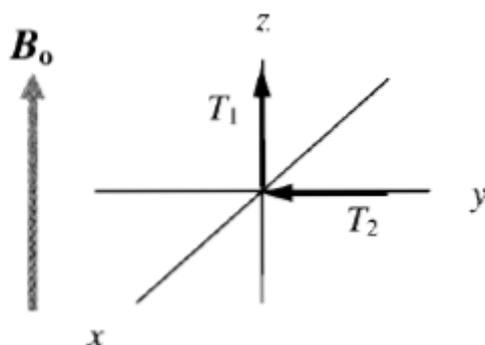
separação dos sinais no espectro devem ser levados em consideração a fim de obter uma quantificação acurada.

1.2.3 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS DADOS PARA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR QUANTITATIVA (RMN-q)

Os parâmetros instrumentais que devem ser considerados para a aquisição dos espectros de -RMN-q são pulso de excitação, tempo de repetição, tempo de aquisição, domínio do tempo, relação sinal/ruído, resolução digital, zero filling (preenchimento com zeros) shimming (homogeneidade do campo magnético), temperatura, precisão do tubo de RMN e supressão do solvente (BHARTI et al., 2012, HOLZGRABE et al., 2010 e PAULI et al., 2014).

Geralmente uma sequência de pulsos de 90° são usados para gravar os espectros de RMN, pois este pulso fornece a intensidade máxima das linhas de ressonância. Depois de aplicado o pulso de excitação ocorre a magnetização induzida dos spins e em seguida os spins excitados relaxam de duas formas, uma através da relaxação longitudinal ou relaxação spin-rede T_1 e outra através da relaxação transversal ou spin-spin T_2 que ocorrem de forma simultânea. A relaxação longitudinal (T_1) compreende na magnetização dos spins ao longo do eixo Z, enquanto que a relaxação transversal compreende na magnetização dos spins ao longo do eixo XY (fig. 3). T_2 é um processo de diminuição da magnetização, onde ocorre uma heterogeneidade da magnetização durante o FID e isso afeta a largura das linhas de ressonância (SILVERSTEIN, 1963).

Figura 3 – Relação entre a relaxação longitudinal (T_1) e a relaxação transversal (T_2) (SILVERSTEIN, 1963).



Um atraso no tempo de relaxamento é chamado tempo de espera e em seguida ocorre a aquisição dos sinais em um tempo (t_2) (fig.4) (SILVERSTEIN, 1963). O comprimento do pulso deve ser calibrado para cada amostra a fim de obter melhor exatidão e precisão (BHARTI et al., 2012).

Figura 4 – Sequência de pulso padrão para um experimento de RMN-¹H (SILVERSTEIN, 1963).



O tempo de repetição é o tempo gasto para a aquisição de um espectro de uma varredura e ele depende do T_1 (BHARTI, 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). Idealmente o tempo de repetição deve ser cinco vezes o T_1 mais longo (BHARTI, 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). O tempo de aquisição deve ser suficiente para evitar truncamento no FID e levar a erros na obtenção dos espectros (BHARTI et al., 2012).

Os dados com um determinado número de pontos no domínio do tempo também apresentam influência nas medidas de RMN-q, o número de pontos dos dados deve ser suficiente para uma boa resolução do espectro a fim de serem realizadas medidas quantitativas (BHARTI et al., 2012).

O número de varreduras no espectro deve ser determinado a fim de obter uma relação sinal/ruído adequado para que todos os sinais possam ser usados e a fim de obter resultados precisos. Se a concentração do analito for muito baixa então o número de varreduras deve ser aumentado (PAULI et al., 2014 e BHARTI et al., 2012). Os espectros de RMN também devem ser obtidos com uma adequada resolução digital. A resolução digital de um espectro em Hertz/ponto é igual à largura espectral dividida pelo número de pontos dos dados. Os dados de RMN devem possuir uma adequada resolução digital para uma análise quantitativa (BHARTI et al., 2012). O zero filling ou preenchimento dos espectros com zeros é a adição de pontos iguais a zero no conjunto de pontos de dados para aumentar a resolução digital do espectro (HOLZGRABE et al., 2010).

Outro parâmetro que deve ser ajustado é a homogeneidade do campo magnético (shimming) em torno da amostra, pois a não homogeneidade do campo magnético cria uma distorção do sinal ou formas de picos incorretos o que acarreta em uma baixa resolução do espectro. A temperatura durante o experimento deve ser mantida constante, pois a variação da temperatura afeta as propriedades de relaxamento das moléculas (BHARTI et al., 2012 e HOLZGRABE et al., 2010). Os tubos de RMN precisam ter o mesmo diâmetro quando várias amostras forem medidas, pois diferenças nos diâmetros dos tubos acarretam em erros (BHARTI et al., 2012), pois tubos com diâmetros diferentes podem comportar quantidades diferentes de amostras e assim provocar variações nas concentrações das amostras.

A supressão do sinal do solvente pode ser necessária se o seu sinal for maior do que o sinal do analito ou se há sobreposição do sinal do solvente e do analito. Para isto a técnica de supressão do solvente envolve a aplicação de um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente seguido de outro pulso de ângulo mais curto e de maior intensidade. O primeiro pulso promove a transição dos spins do estado fundamental para o estado excitado. Se a velocidade de excitação exceder o tempo de relaxamento longitudinal os níveis populacionais tornam-se iguais e o sinal do solvente não é observado (DUARTE et al., 2011).

Uma vez que os parâmetros de aquisição dos espectros foram ajustados a fim de obter os dados de -RMN-q, eles precisam ser tratados corretamente.

Isso significa realizar uma correção na fase, correção da linha de base e integração dos sinais para as medidas quantitativas (BHARTI et al., 2012 e PAULI et al., 2014). A correção manual da fase do espectro pelo analista para fins quantitativos é preferida ao invés da correção automática (PAULI et al., 2014), pois na correção automática os sinais pequenos podem ser distorcidos (BHARTI et al., 2012). Assim, para uma correção de fase adequada é necessário realizar uma expansão vertical do espectro o máximo possível. Um espectro onde a fase não foi corretamente ajustada pode causar um erro significativo na medição do pico e até erros na concentração absoluta e relativa dos compostos no espectro (BHARTI et al., 2012), por exemplo, um erro de 5° na correção da fase altera o valor da integral em 1 % (PAULI et al., 2014). A linha de base geralmente é corrigida de modo automático, mas o preferível é a correção manual assim como a correção da fase. Uma linha de base incorreta leva a um erro significativo na integração do pico e subsequente quantificação (BHARTI et al., 2012). A integração da área do pico é uma etapa crucial-RMN-q, para cobrir 99 % da área total do pico a região a ser integrada deve ser estendida para vinte vezes a largura do pico em ambas as direções (BHARTI et al., 2012). O sinal usado para a quantificação deve estar separado dos demais sinais e de preferência deve ser um singlete ao invés de um múltiplo (BHARTI et al., 2012 e HOLZGRABE et al., 2010).

Assim, independentemente da natureza da amostra, metabólitos, medicamentos, comida, bebidas ou agroquímicos, por exemplo, nas análises de -RMN-q os parâmetros para a aquisição do espectro e o processamento dos dados devem ser cuidadosamente consideradas a fim de alcançar um alto grau de acurácia e precisão das medidas (BHARTI et al., 2012 e HOLZGRABE et al., 2010).

1.2.4 UMA BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS ARTIGOS DE REVISÃO SOBRE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) EM ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

Foram analisados sete artigos de revisão que abordam RMN, medicamentos e análises farmacêuticas (PIETERS et al., 1989; JAMES et al.,

1995; KARTASHOV et al., 1996; HOLZGRABE et al., 1998; HOLZGRABE et al., 2005; HOLZGRABE et al., 2010; HOLZGRABE et al., 2011 e MAGGIO et al., 2014). O objetivo da análise foi realizar uma revisão bibliográfica para esta tese a fim de verificar quais medicamentos tinham sido analisados por RMN de ¹H.

De acordo com os respectivos artigos citados acima se observou que a maioria das revisões da literatura relatavam diferentes abordagens da RMN (HOLZGRABE et al., 1998; PIETERS et al., 1989; HOLZGRABE et al., 2010); quais núcleos podem ser observados através da RMN e quais deles são rotineiramente usados para a análise (HOLZGRABE et al., 1998 e PIETERS et al., 1989); quais as informações podem ser obtidas através dos espectros de RMN; quais são as vantagens e desvantagens da técnica (PIETERS et al., 1989; HOLZGRABE et al., 1998 e MAGGIO et al., 2014); como aumentar a sensibilidade da RMN (MAGGIO et al., 2014); as abordagens instrumentais da RMN (JAMES et al., 1995); comparação entre a técnica de RMN e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês High Performance Liquid Chromatography) (HOLZGRABE et al., 1998; HOLZGRABE et al., 2005 e MAGGIO et al., 2014); aspectos fundamentais da técnica de ressonância magnética nuclear quantitativa (RMN-q) e como otimizar os parâmetros experimentais (HOLZGRABE et al., 2005; HOLZGRABE et al., 1998; HOLZGRABE et al., 2010; HOLZGRABE et al., 2011 e JAMES et al., 1995).

A RMN pode ser usada para a análise de diversas amostras, como por exemplo, produtos naturais, peptídeos, agroquímicos, comidas, bebidas, perfil metabólico e impressão digital de produtos naturais, fluidos corporais, como por exemplo, urina, bile, sangue ou plasma. Ela também pode ser usada em metabolômica para diagnóstico de doenças, para a quantificação de medicamentos e de compostos orgânicos (PIETERS et al., 1989; HOLZGRABE et al., 1998 e HOLZGRABE et al., 2010).

Dentro desta diversidade de amostras os núcleos que podem ser analisados na RMN são ¹³C, ¹⁹F, ¹H, ³¹P, ¹⁵N e ¹⁷O, porém os menos usados para a análise devido a sua baixa abundância na natureza são ¹⁵N e ¹⁷O (HOLZGRABE et al., 1998), assim de modo geral as análises de RMN são feitas com os núcleos de ¹H e ¹³C (PIETERS et al., 1989). A técnica de RMN possui diversas vantagens, como por exemplo, ela exige uma preparação mínima da amostra, ou seja, geralmente só é necessária a dissolução da amostra em um

solvente deuterado com um padrão interno (HOLZGRABE et al., 2010); possui natureza não destrutiva e permite a fácil preparação da amostra (MAGGIO et al., 2014); vários componentes em uma mistura podem ser determinados simultaneamente sem a necessidade de separação em um curto período de tempo (MAGGIO et al., 2014 e PIETERS et al., 1989) e apesar da menor sensibilidade do núcleo de ¹³C em relação ao de ¹H ele possui uma grande extensão de deslocamento químico se comparado ao hidrogênio (PIETERS et al., 1989).

Em contrapartida a RMN apresenta desvantagens como o alto custo do equipamento e a baixa sensibilidade em comparação com outras técnicas como HPLC ou LC-MS. Se compararmos a RMN com HPLC várias vantagens podem ser listadas, como por exemplo, nas análises de RMN pode-se fazer uma análise qualitativa, ou seja, determinar a estrutura e uma análise quantitativa, ou seja, realizar a quantificação da mesma simultaneamente. A quantificação pode ser realizada na RMN com a integração dos sinais e ela pode ser tão precisa e acurada do que aquela realizada com o HPLC. Não há a necessidade de isolar as impurezas; uma mesma amostra de referência pode ser usada para quantificar compostos diferentes; a RMN na maioria das vezes é mais rápida e fácil de executar, porque no HPLC muito tempo é gasto para o equilíbrio da coluna, no processo de derivatização ou no preparo das amostras. Então a RMN acaba consumindo menos tempo e possui alta reprodutibilidade (HOLZGRABE et al., 1998 e HOLZGRABE et al., 2005). Com HPLC exigem-se grandes volumes de solventes, porém na RMN acaba sendo mais viável, pois apesar da necessidade do solvente deuterado que é caro usa-se um pequeno volume o que acaba compensando o seu uso em relação ao HPLC que é mais barato, porém gasta grandes volumes de solventes (HOLZGRABE et al., 2005) e por isso gasta-se muito tempo para a otimização dos parâmetros instrumentais e para estabelecer o protocolo de análise. As vantagens da RMN em relação ao UHPLC ainda podem ser listadas, como por exemplo, nos experimentos de RMN não há contaminação do equipamento com a amostra, pois a mesma não tem contato direto com a parte interna do equipamento ao contrário do que acontece com o HPLC onde a amostra passa através da coluna cromatográfica que se não estiver completamente limpa e sem resquícios de compostos de uma corrida

anterior pode ocasionar na contaminação da próxima amostra a ser analisada (HOLZGRABE et al., 1998).

A RMN também pode ser usada para avaliar a quantidade de solvente residual, para determinar a composição isomérica, ou seja, a razão de diastereoisômeros e o excesso enantiomérico através do uso de um reagente enantiomérico (JAMES et al., 1995); para determinar a razão molar de medicamentos (HOLZGRABE et al., 2005); para investigar os metabólitos em fluidos corporais (HOLZGRABE et al., 1998); para a identificação de ingredientes ativos e excipientes (MAGGIO et al., 2014 e JAMES et al., 1995); para caracterizar um polímero na maioria das vezes em uma mistura onde ele é usado como excipiente (HOLZGRABE et al., 2011), para o estudo da estabilidade (KARTASHOV et al., 1996 e HOLZGRABE et al., 1998); para ensaios de falsificação (HOLZGRABE et al., 2010) e para o monitoramento de caminhos metabólicos de medicamentos fluorados com a RMN de ¹⁹F (HOLZGRABE et al., 1998).

Dentro da análise de medicamentos por RMN análises no estado sólido não são muito usadas, mas podem oferecer vantagens. A RMN do estado sólido pode ser vista como uma técnica complementar a cristalografia de raios X (DRX) para obter informações estruturais de medicamentos no estado sólido, ela fornece então uma indicação imediata de qualquer configuração ou conformação que pode existir no sólido (HOLZGRABE et al., 1998). Assim, a RMN do estado sólido para os núcleos de ¹⁵N e ³¹P serve para estudos de polimorfismo e conformação das drogas (HOLZGRABE et al., 1998 e HOLZGRABE et al., 2010). Na tabela 1 abaixo podemos observar os tipos de medicamentos analisados nos respectivos artigos de revisão citados anteriormente.

Tabela 1 - Medicamentos, solventes, padrões internos e quantidade detectada em alguns artigos de revisão.

Medicamento	Solvente	Padrão	Quantidade detectada	Técnica de análise	Referência
Nitrito de amila	CCl ₄	Benzoato de benzilo	Não	RMN ¹ H e ¹³ C	PIETERS, et al.,1989
Cloreto de succionila	D ₂ O	Acetamida	Não	RMN ¹³ C	PIETERS, et al.,1989
Cefradina					
Pecticilina					
Dextrometorfano	D ₂ O	Dioxano	Não	RMN ¹³ C	PIETERS, et al.,1989
Levometorfano					
Gentamicina					
Heparina	D ₂ O	Brometo de tetrametilamônio	Não	RMN ¹³ C	PIETERS, et al.,1989
Pilocarpina					
Aspirina					PIETERS, et al.,1989
Cafeína	D ₂ O	Dioxano	Não	RMN ¹³ C	
Fenacetina					
Etenzamida					

Tabela 1 – completa.

Medicamento	Solvente	Padrão	Quantidade detectada	Técnica de análise	Referência
Cloridrato de celiprolol	Clorofórmio	TMSP-Na	Não	RMN ¹ H e ¹⁹ F	JAMES et al., 1995
Cloridrato de fluoxetina					
Ibuprofeno	C ₂ H ₅ OH	-	Não	RMN ¹ H	JAMES et al., 1995
Heparina	D ₂ O	-	Não	RMN ¹ H	HOLGRABE et al., 2011.
Viagra	D ₂ O	-	Não	RMN ¹ H	HOLGRABE et al., 2011.

De acordo com a tabela 1 podemos observar que vários medicamentos diferentes foram analisados por RMN de ¹H e de ¹³C. No artigo de PIETERS et al., 1989 ele demonstra a aplicação da RMN quantitativa na análise de vários medicamentos conforme a tabela 1 acima, HOLZGRABE et al., 2005 aponta a - RMN-q para a quantificação de impurezas resultantes do caminho de síntese do medicamento e produto de degradação resultante. JAMES et al., 1995 usou a RMN do estado sólido para a análise quantitativa de alguns medicamentos e HOLZGRABE et al., 2005 apontou a análise de alguns medicamentos por RMN.

Deste modo observamos que os respectivos artigos de revisão analisados abordaram aspectos fundamentais da técnica, parâmetros para as medidas quantitativas e como realizar a otimização de tais parâmetros para a obtenção de dados experimentais precisos. Os artigos de revisão não possuem uma lista

ampla de quais medicamentos foram analisados até o momento, mostrando simplesmente exemplos isolados. Assim, para a análise de um determinado medicamento de interesse é necessário fazer uma revisão bibliográfica individualizada.

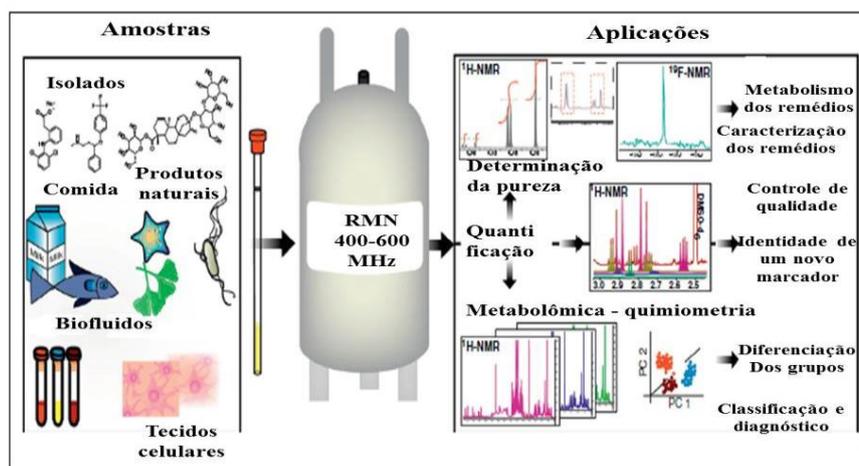
1.2.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) COMO TÉCNICA PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

Em análise e controle de qualidade de medicamentos existem várias técnicas que são usadas para tal finalidade, como por exemplo, IR, UV, HPLC, cromatografia em camada delgada (TLC) e RMN (GOROG, 2015).

As espectroscopias IR e de UV são técnicas descritas em todas as farmacopeias. A primeira como método de identificação, pois as bandas são específicas para cada grupo funcional o que permite a identificação de uma molécula. Já a segunda é considerada um teste menos específico do que o IR, porém é usado para o controle de qualidade dos medicamentos para verificar a presença e/ou quantidade do ingrediente ativo. Já as técnicas cromatográficas, como por exemplo, HPLC e a TLC são ambas usadas como testes de identificação de medicamentos. No HPLC não há necessidade de realizar uma separação para fazer o teste e os resultados podem ser questionados com relação à precisão se há uma grande quantidade de amostras para serem analisadas. Por último, a RMN que é usada somente em poucos casos para a identificação dos medicamentos em farmacopeias (GOROC, 2015).

A RMN em muitos casos é uma ferramenta mais adequada do que as técnicas cromatográficas com detecção espectroscópica, porque impurezas presentes podem não ter absorção espectroscópica ou ter um comportamento cromatográfico bem diferente, assim que saem no pico de injeção ou ficam na coluna. Além disso RMN oferece a possibilidade de determinar a quantidade de uma substância em misturas sem a exigência de uma substância de referência para cada composto detectado, como é praticamente necessário para outras técnicas analíticas como HPLC e cromatografia gasosa (GC) (SHEN, 2015). A figura 5 abaixo exhibe os diversos tipos de amostras e aplicações da RMN-¹H.

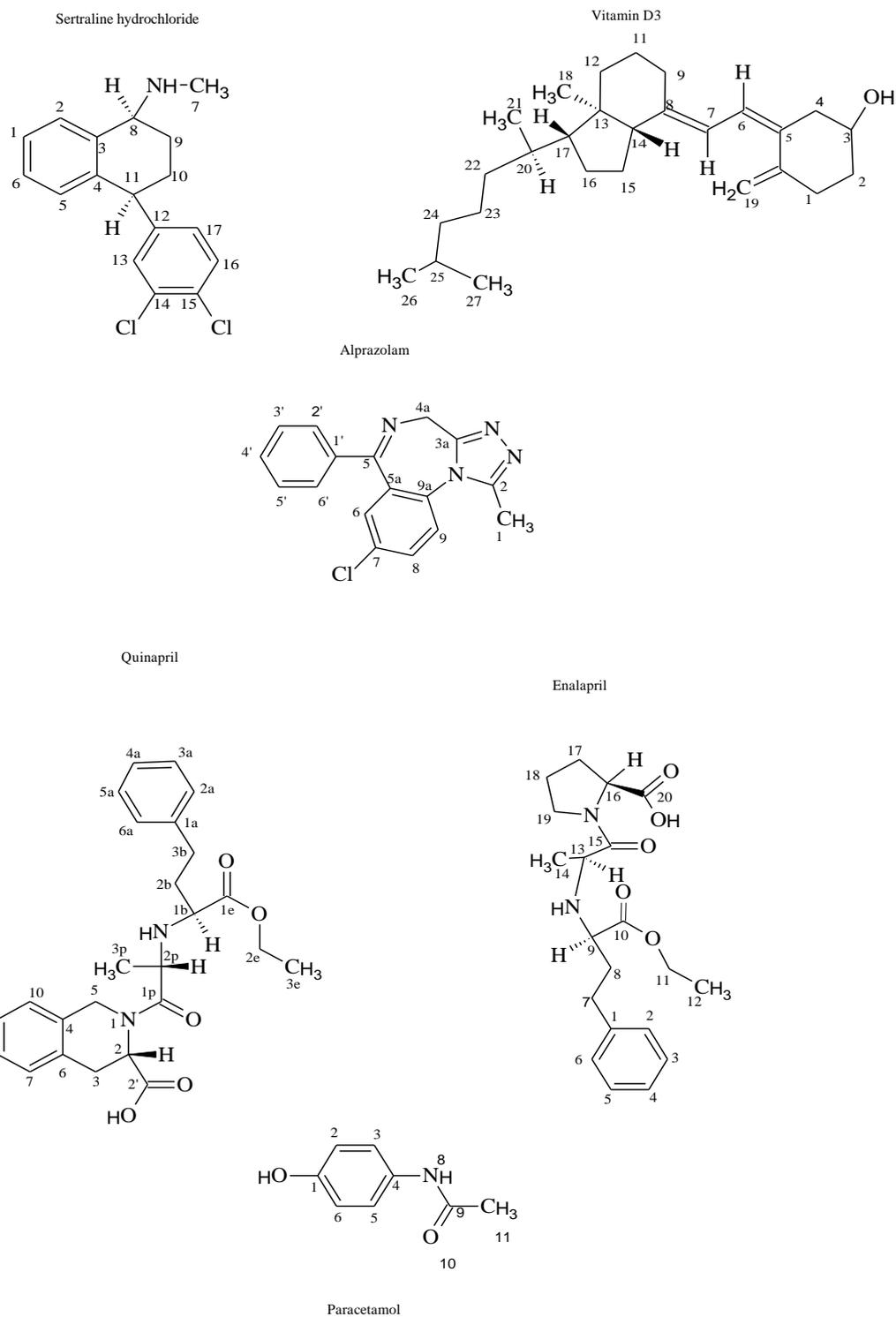
Figura 5 - Variedade de amostras e aplicações da RMN quantitativa de hidrogênio adaptado de SIMMLER, 2014.



Levando-se em consideração a capacidade da RMN de fazer uma análise qualitativa e quantitativa simultaneamente de forma rápida, foram então analisados seis medicamentos: cloridrato de sertralina, alprazolam, vitamina D₃, quinapril, maleato de enalapril e paracetamol, todos medicamentos de amplo uso e fácil aquisição. O primeiro, o cloridrato de sertralina ou (1S,4S)-cis-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahydro-N-metil-1-naftaleno hidro cloridrato é um antidepressivo administrado oralmente (NOVOSELSKY, 2002). Ele é usado para o tratamento de todos os tipos de depressão, mas também serve para desordens do pânico, fobia social, obesidade ou desordem obsessiva compulsiva (REYES, 2014). O segundo, o alprazolam ou 8-cloro-1-metil-6-fenil-4H-s-triazolo [4,3-a][1,4]-benzodiazepina é um derivado da benzodiazepina que é usado para o tratamento da ansiedade generalizada, ataques de pânico com ou sem fobia e para a depressão (HUIDOBRO, 2006). Enquanto que o terceiro, a vitamina D₃ serve para a mineralização óssea e a homeostase do cálcio (MIZHIRITSKII, 1996). O quarto medicamento analisado o maleato de enalapril ou {L-proline, 1-[N-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl}-(S)} e o quinto, o quinapril ou [3S[2[R*(R*)],3R*]]-2-[2-[[1-(etoxi-carbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinacarboxílico ácido ambos são usados para o tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca (GUMIENICZEK, 1998; SHEN, 2015; ZOPPI, 2005; TRABELSI, 2000 e SHEN, 2015). O sexto e penúltimo fármaco analisado foi o paracetamol ou N-(4-hidroxil) acetanilida é um

medicamento usado para atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória (SINGH, 2017). A figura 6 exhibe a estrutura de todos os fármacos analisados.

Figura 6 - Estruturas químicas para sertralina, alprazolam e vitamina D₃, quinapril, enalapril e paracetamol.



Assim, para confirmar a identidade de um medicamento (ingrediente ativo), falsificação e/ou adulteração, a RMN foi usada neste trabalho como uma ferramenta analítica para fazer uma investigação inicial sobre a identidade de alguns deles, mostrando desta forma a sua importância como uma primeira técnica de análise para uma triagem inicial da qualidade de um medicamento e que posteriormente ele pode ser investigado por outras técnicas.

1.3 OBJETIVOS

- ✓ Estabelecer um método rápido e simples para verificar se a qualidade e dosagem de um medicamento estão corretas ou não;
- ✓ Estabelecer um protocolo geral para análises de diferentes medicamentos;
- ✓ Fazer uma investigação inicial através da técnica de RMN.

1.4 METODOLOGIA

Na metodologia de trabalho podem ser distinguidos duas partes: o preparo das amostras dos medicamentos, com a escolha do solvente e do padrão interno apropriado e depois a análise dos mesmos por RMN. As etapas da metodologia serão descritas a seguir. As amostras foram preparadas no Laboratório de Metabolômica, no departamento de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), conforme o protocolo de análise de remédios, citado abaixo no item 1.4.1.

1.4.1 METODOLOGIA DE PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H)

A metodologia de preparo dos medicamentos para a análise da RMN está representada na figura 7. O que mudou de um medicamento para o outro foi à quantidade de amostra processada, o solvente e o padrão interno. Os dados dos seis medicamentos estão listados na tabela 2.

Primeiro mediu-se a massa em um eppendorf, depois foi adicionado o respectivo volume do solvente com o padrão interno. Em seguida o eppendorf foi colocado em vortex por 10 min e depois foi ao ultrassom por mais 10 min. E então a mistura foi centrifugada por 10 min e o sobrenadante foi coletado e colocado em um tubo de RMN e em seguida levado para a análise.

Figura - 7 - Esquema do protocolo de análise e extração da metabolômica, adaptado (SCHRIPEMA et al, 2018).

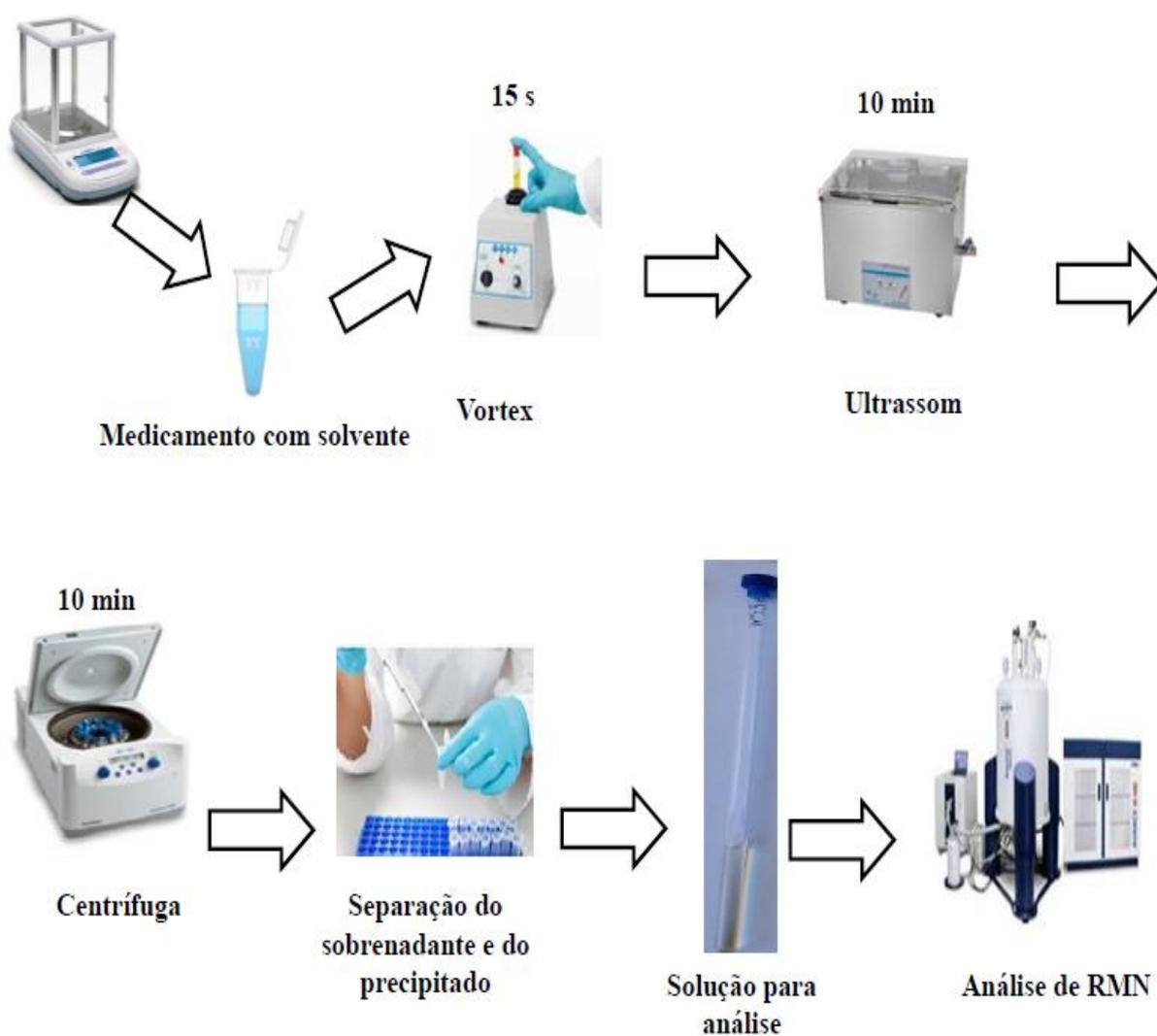


Tabela 2 - Medicamentos analisados, quantidade pesada, solvente e padrão interno usado na sua metodologia de preparo.

Medicamento	Massa do comprimido (mg)	Massa do comprimido analisada (mg)	Solvente (ml)	Padrão interno
Cloridrato de sertralina 50 mg	106	23	CDCl ₃ 0,70	Piridina
Alprazolam 2 mg	152	50	CDCl ₃ 0,80	Piridina
Vitamina D ₃ 0,25 mg	284	100	CDCl ₃ 0,80	Piridina
Quinapril 20 mg	186	100	D ₂ O 1.00	TMSP-Na
Maleato de enalapril 5 mg	229	10	D ₂ O 0,80	TMSP-Na
Paracetamol 750 mg	834	30	DMSO-d ₆ 0,70	Piridina

Foram analisadas nove marcas do medicamento cloridrato de sertralina, quatro marcas do medicamento alprazolam, três marcas da vitamina D₃, duas marcas de quinapril, quatro marcas do maleato de enalapril e duas marcas de

paracetamol. Em cada análise um único comprimido de cada uma das marcas foi analisado, pois o objetivo era demonstrar que a metodologia proposta era adequada para verificar a qualidade dos medicamentos através de uma análise qualitativa rápida por RMN.

1.4.2 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H)

Os espectros de RMN-¹H foram gravados em um espectrômetro BRUKER Avance III HD operando a frequência de 500 MHz para ¹H. Os espectros foram registrados a 25°C com o programa de pulso padrão zg 30, com um tempo de aquisição de 2,6 segundos e com um tempo de relaxamento de 1 s adquirindo 64 K pontos de dados. 100 scans foram registrados.

Os espectros de RMN-¹H foram processados no software Delta v 5.0.2 (Jeol Ltd., USA). O FID foi multiplicado com a função Exponencial, com um LB de 0,2 Hz. A fase foi ajustada manualmente e uma correção automática da linha de base foi aplicada. O espectro foi calibrado para o sinal do solvente e então os espectros foram processados. Os pontos de dados foram exportados para o programa OriginPro 8.5.1 para a confecção dos espectros.

1.4.3 CÁLCULOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS INGREDIENTES ATIVOS DAS AMOSTRAS DOS MEDICAMENTOS

Para demonstrar como foram realizados os cálculos de quantificação, a amostra do medicamento cloridrato de sertralina será usada como exemplo para os cálculos dos demais medicamentos. A massa de um comprimido de cloridrato de sertralina é 158 mg com 50 mg do ingrediente ativo. Foi pesado 23 mg do comprimido. A quantificação foi feita com base na razão do padrão (piridina) dissolvido no solvente (clorofórmio) (151 mg para 99,58 g). Então, 0,70 mL de clorofórmio foi pesado, o equivalente a 1,05 mg e a massa da piridina neste volume foi encontrado pela proporção da piridina dissolvida no clorofórmio, resultando em 1,311 mg. Subsequentemente, a massa da piridina foi convertida em milimols (mmols) através da sua fórmula molecular. Um total de 0,01659

mmols de piridina foi encontrado. Então, o sinal de RMN apropriado da sertralina foi escolhido em 6,9 ppm (¹H) devido a não sobreposição com outros sinais dos hidrogênios do ingrediente ativo do medicamento e integrado. O sinal da piridina em 8,6 ppm (2H) também foi integrado e multiplicado por dois. Então, a razão 1,26 entre os dois sinais de RMN integrados foi obtida. Esta razão (1,26) foi multiplicada pelo número de mmols de piridina (0,01659) para encontrar o número de mmols de sertralina (0,020179) e o número de mmols foi convertido em massa (6,9 mg) através da massa molecular da sertralina. Então, a massa da sertralina encontrada (6,9 mg) foi multiplicada pela massa do comprimido (151 mg) e dividido pela massa pesada (23 mg) para obter a massa da sertralina no comprimido (47 mg). O passo a passo destes cálculos encontra-se abaixo:

$$Q_{\text{(sertralina/comprimido)}} = n_{\text{(piridina)}} \times \frac{I_s}{I_p} \times \frac{H_p}{H_s} \times MM_{\text{(sertralina)}} \times \frac{P_c}{M_p} = 46 \text{ mg}$$

$$\text{Massa}_{\text{(piridina)}} = \left(\frac{\text{massa do padrão dissolvida no solvente} \times \text{massa pesada do solvente}}{\text{massa do solvente}} \right) = \frac{158 \text{ mg piridina} \times 0,9148 \text{ g CDCl}_3}{99,58 \text{ mg CDCl}_3} = 1,311$$

$$n_{\text{(piridina)}} = 1,311/79 = 0,0175$$

$$R1 = \left(\frac{I_s}{I_p} \right) = \left(\frac{\text{integral da sertralina}}{\text{integral da piridina}} \right) = \frac{0,31}{0,51} = 0,6078$$

$$R2 = \left(\frac{H_p}{H_s} \right) = \left(\frac{\text{número de hidrogênios da piridina}}{\text{número de hidrogênios da sertralina}} \right) = \frac{2}{1} = 2$$

$$MM_{\text{(sertralina)}} = \text{massa molecular da sertralina} = 342,68$$

$$R3 = \left(\frac{P_c}{M_p} \right) = \frac{\text{massa do comprimido}}{\text{massa do comprimido pesada}} = \frac{153}{23}$$

Então a quantidade de cloridrato de sertralina encontrada foi de 46 mg em um comprimido. Esse mesmo cálculo foi realizado para as demais amostras de medicamentos analisados.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.5.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os solventes foram selecionados de acordo com a solubilidade de cada ingrediente ativo através de uma pesquisa na literatura (SHEN et al., 2015; ZOPPI et al., 2005; SANTOS et al., 2013; NOVOSELSKY et al., 2002; HELMER et al., 1985; MIZHIRITSKII et al., 1996; SALSBURY et al., 2005; HUIDOBRO et al., 2006; MASSAH et al., 2016; TRABELSI et al., 2000 e ALI et al., 2006). O clorofórmio (CDCl₃) foi escolhido para a extração dos seguintes medicamentos cloridrato de sertralina, alprazolam e vitamina D₃, enquanto que a água deuterada (D₂O) foi usada para analisar o quinapril, maleato de enalapril e o dimetilsulfoxido (DMSO-d₆) foi usado para analisar o paracetamol.

Estes solventes são relativamente baratos se comparados a outros solventes deuterados que são comumente usados em análise de RMN, como por exemplo, acetonitrila (C₂H₃N), acetona (C₃H₆O), benzeno (C₆H₆), diclorometano (CH₂Cl₂), metanol (CH₃OH), tetrahidrofurano (C₄H₈O) e tolueno (C₇H₈). Esses solventes foram listados de acordo com a ordem de polaridade na tabela 3.

Tabela 3 - Solventes deuterados listados em ordem de polaridade usados em RMN e os seus respectivos preços.

Solvente	Deuteração	Volume (mL)	Preço (USD)	Preço/mL (USD)
Óxido de deutério	99,9	90,33	128	1,42
Metanol-d ₄	99,8	112,61	894	7,94
Dimetilsulfóxido -d ₆	99,9	84,03	128	1,52
Acetonitrila-d ₃	99,8	118,48	520	4,38
Tetrahidrofurano-d ₈	99,5	10,00	429	4,29

Tabela 3- completa.

Solvente	Deuteração	Volume (mL)	Preço (USD)	Preço/mL (USD)
Acetona-d ₆	99.9	114.67	328	2.86
Diclorometano-d ₂	99.8	7.345	157	21.37
Clorofórmio-d ₆	99.8	66.66	45,75	0.69
Benzeno-d ₆	99.6	105.26	327	3.11
Tolueno-d ₈	99.6	10.6	97	9.15

Clorofórmio foi usado para obter extratos apolares, enquanto que água e dimetilsulfoxido foram usados para obter extratos mais polares (SCHRIPSEMA, et al., 2010 e SCHRIPSEMA et al., 2014). Erros na transferência de volume puderam ser corrigidos pela adição de um padrão interno e com a pesagem de todas as quantidades transferidas, permitindo assim as quantificações (SCHRIPSEMA et al., 2014).

A piridina (C₅H₅N) e o sal de sódio de ácido - 2,2,3,3-D₄ (trimetilsilil) propanoico (TMSP-Na) foram os padrões internos adequados e escolhidos para as análises, pois os sinais deles não se sobrepuseram com os sinais dos analitos avaliados e apareceram separadamente no espectro de RMN (ALI et al., 2006). Os sinais da piridina foram detectados em 8,6 ppm (d, H-2 e H-4), 7,7 ppm (d, H-1 e H-5) e 7,3 ppm (H-3), enquanto que o ácido trimetilpropanoico também foi usado para a calibração do deslocamento químico e aparece em 0,00 ppm.

A seguir encontra-se o espectro de RMN-¹H de um medicamento do cloridrato de sertralina analisado (figura 8). Todos os sinais dos hidrogênios da sertralina foram claramente observados (tabela 4).

Figura 8 - Espectro de RMN-¹H do medicamento do cloridrato de sertralina em CDCl₃. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do cloridrato de sertralina.

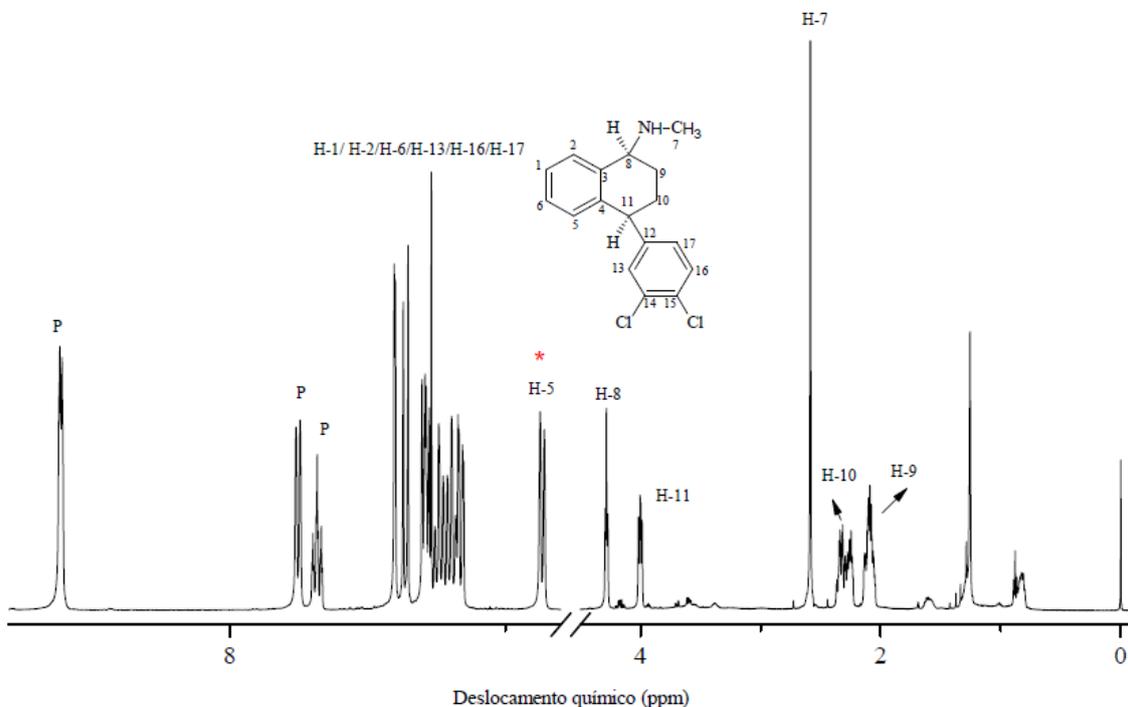


Tabela 4 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H para o medicamento contendo cloridrato de sertralina em CDCl₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (SALSBURY et al., 2005).

$\delta^1 \text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1 \text{H}$ (Medicamento)
4,3	s	H-8	4,3
4,0	dd	H-11	4,0
2,6	s	H-7	2,6
2,3	m	H-10a	2,3
2,2	m	H-9a	2,2
2,1	m	H-9b	2,1

Tabela 4 – completa.

¹ δ H (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	¹ δ H (Medicamento)
2,0	m	H-10b	2,0
6,9	d	H-5	6,8

A quantidade detectada na amostra do medicamento de cloridrato de sertralina foi de 47 mg. Os dados dos cálculos estão representados na tabela 5. Houve pouca variação nas quantidades mostrando que os medicamentos satisfizeram o exigido. Quando análises mais exatas das quantidades são exigidos, o RMN pode ser feita de maneira quantitativa, como descrito anteriormente, mas isso vai levar mais tempo. As quantidades também podem ser verificadas com outras técnicas como HPLC.

Tabela 5 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos por RMN-¹H para o medicamento de cloridrato de sertralina analisado.

Medicamento	Sertralina (S)
Massa do solvente (mg)	0,86
Massa da piridina (mg)	1,31
Mols de Piridina (μmol)	16,6
Integral (piridina) δ = 8,6	0,51
Integral (S) δ = 6,9	0,31
Razão (S/piridina)	1,21
Quantidade (S) μmol	20,2
Massa de (S) mg	6,91
Massa do comprimido de S (mg)	158
Massa do comprimido de S pesada	23
Massa de S por comprimido (mg)	47

Os sinais do medicamento de alprazolam analisado encontram-se na figura 9. Na região aromática não estão bem separados o sinal dos hidrogênios do alprazolam dos sinais da piridina. Os respectivos deslocamentos químicos do alprazolam estão mostrados na tabela 6.

Figura 9 - a) Espectro de RMN-¹H do medicamento de alprazolam em CDCl₃ e b) região de ampliação de 7-8 ppm. Numeração não corresponde com estrutura. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do alprazolam.

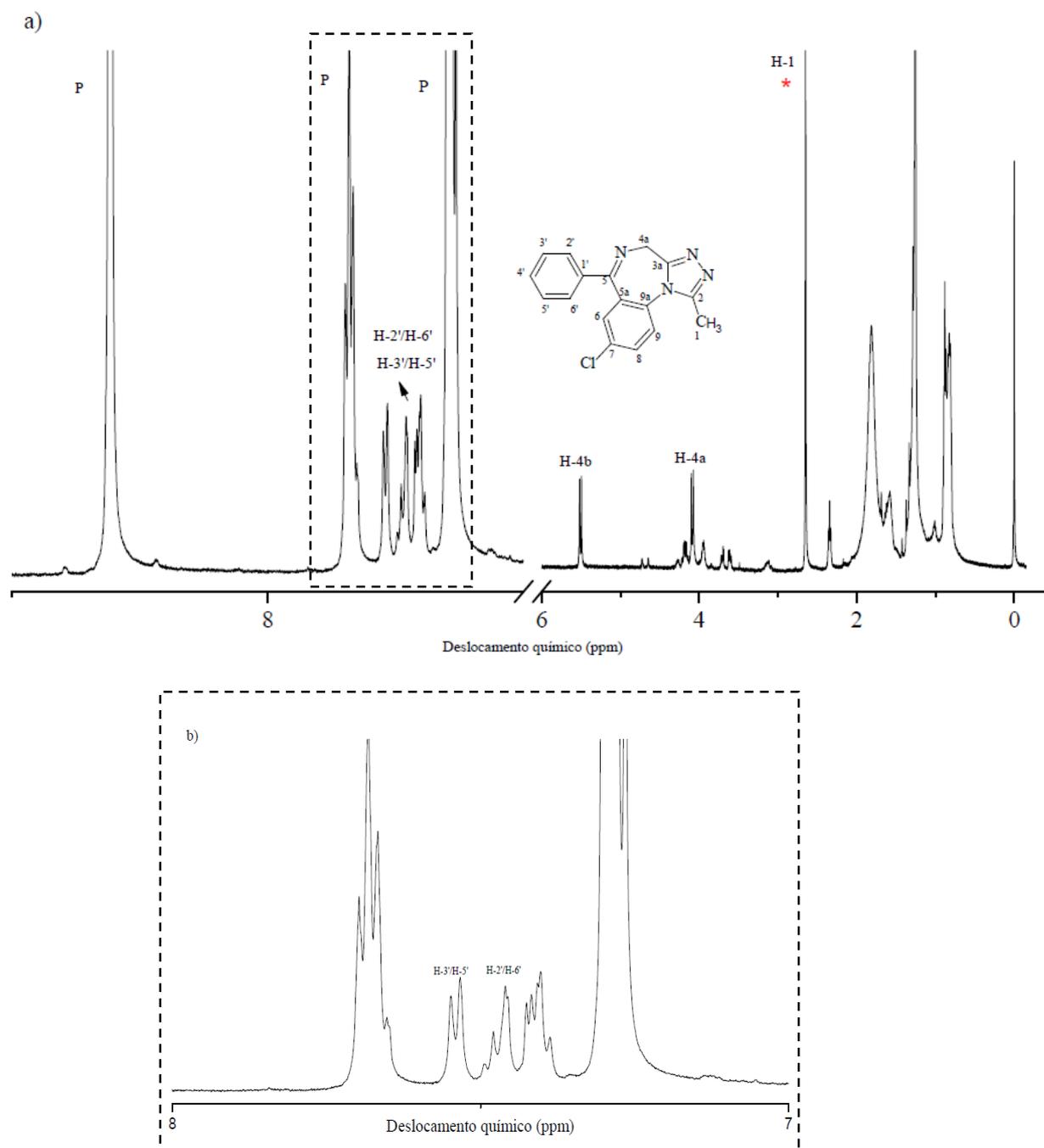


Tabela 6- Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H-para o medicamento contendo alprazolam em CDCl₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (SAFARAZ et al., 2014 e MASSAH et al., 2016).

$\delta^1\text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1\text{H}$ (Medicamento)
2,5	s	H-1	2,3
7,5	d	H-2'/H-6'	7,5
7,5	d	H-3'/H-5'	7,5
4,1	d	H-4 a	4,1
5,5	d	H-4 b	5,5

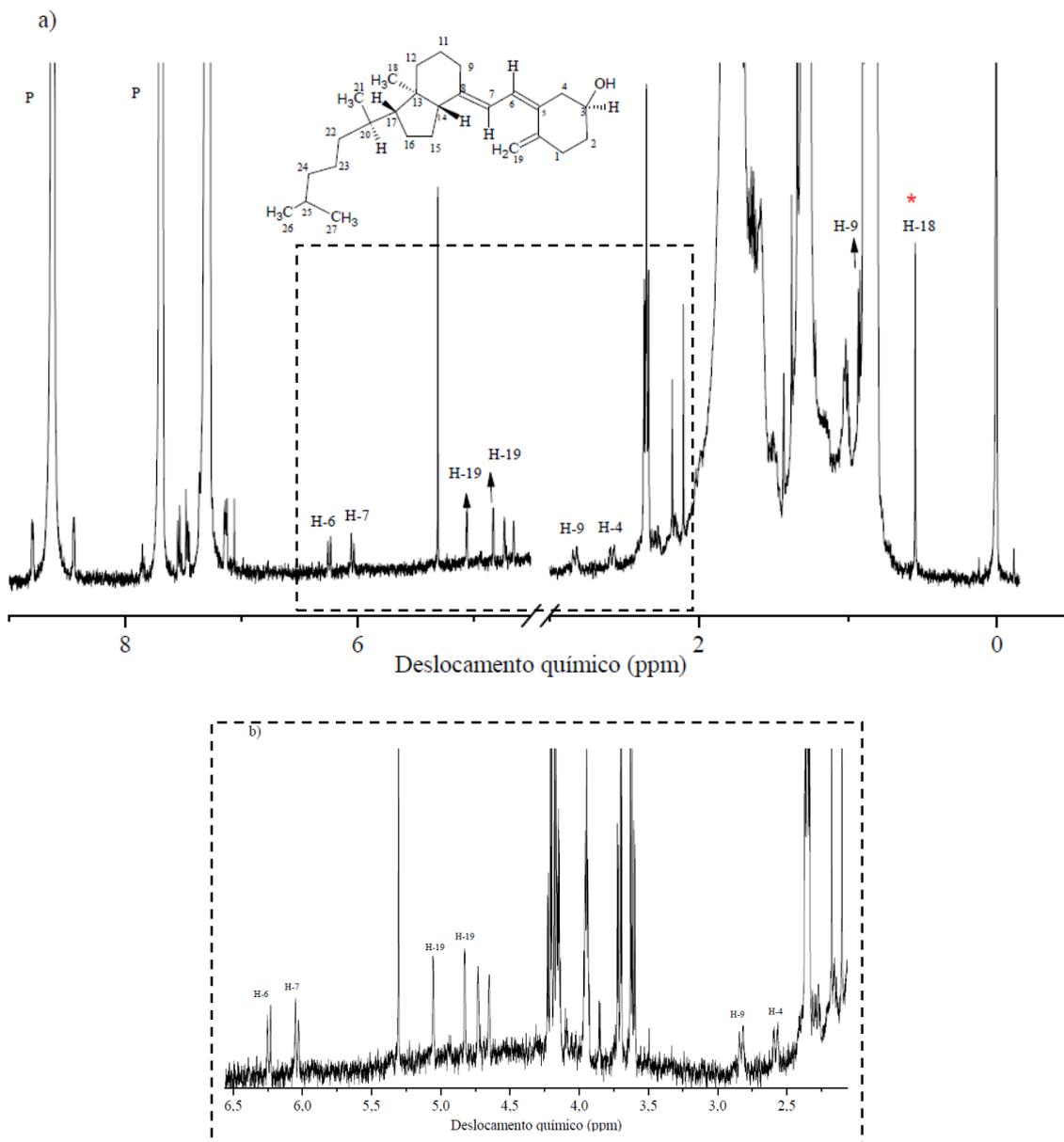
O medicamento do alprazolam mostrou sinais dos hidrogênios do grupo metila a 2,65 ppm (3H) num sinal isolado e adequado para integração. A integral foi comparada com o integral do sinal em 8,6 ppm (2H) dos hidrogênios 3 e 5 da piridina que foram escolhidos para os cálculos da razão das integrais. A quantidade detectada da amostra do medicamento alprazolam foi de 1,5 mg, de acordo com o esperado em um comprimido, conforme pode ser visto na tabela 7.

Tabela 7 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de alprazolam analisados por RMN-¹H.

Medicamento	Alprazolam (A)
Massa do solvente (mg)	0,84
Massa da piridina (mg)	1,31
Mols de piridina (μmol)	16,6
Integral (piridina) $\delta = 8,6$	0,96
Integral (S) $\delta = 2,6$	0,16
Razão (A/piridina)	0,17
Quantidade (A) μmol	1,8
Massa de (A) mg	0,55
Massa do comprimido de A (mg)	131
Massa do comprimido de A pesada	50
Massa de A por comprimido (mg)	1,5

As capsulas da vitamina D₃ contém 10.000 unidades internacionais (UI) o que corresponde a aproximadamente 0,25 mg de vitamina D₃ (40.000 UI= 1 mg). Devido à baixa quantidade de vitamina D₃ presente nas capsulas o espectro da amostra analisada apresentou baixa intensidade dos seus sinais de hidrogênio (figura 10). No entanto, os sinais permitem verificar a identidade e quantidade adequadamente A identificação da vitamina D₃ foi direta através dos sinais observados que correspondiam bem com os sinais apontados pela literatura (tabela 8).

Figura 10 - Espectro RMN-¹H do medicamento de vitamina D₃ em CDCl₃ e b) região de ampliação de 2,5-6,5 ppm. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado da vitamina D₃.



Para a quantificação o sinal em 0,54 ppm (3H) e 3,95 ppm (1H) do medicamento de vitamina D₃ foram selecionados (tabela 8). O espectro do composto foi difícil de interpretar, o que pode ser justificado pela presença de vários excipientes em sua composição, mostrando altas intensidades dos sinais se comparado aos sinais dos ingredientes ativos. Então, para confirmar a presença deste composto no medicamento analisado, as quantidades dos hidrogênios foram primeiramente determinadas. O sinal em 0,54 ppm

corresponde com o grupo metil (C-18) da molécula de vitamina D₃. A quantidade detectada do medicamento de vitamina D₃ foi de 0,1 mg em um comprimido analisado de acordo com a tabela 9.

A quantidade detectada foi abaixo do esperado. Uma análise mais extensa pode revelar se houve problema com somente uma capsula, se há grande variação nas quantidades nas capsulas individuais ou se todo tem quantidades abaixo da quantidade indicado.

Tabela 8 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H para o medicamento contendo vitamina D₃ em CDCl₃ em comparação com aqueles relatados na literatura (HELMER et al., 1985).

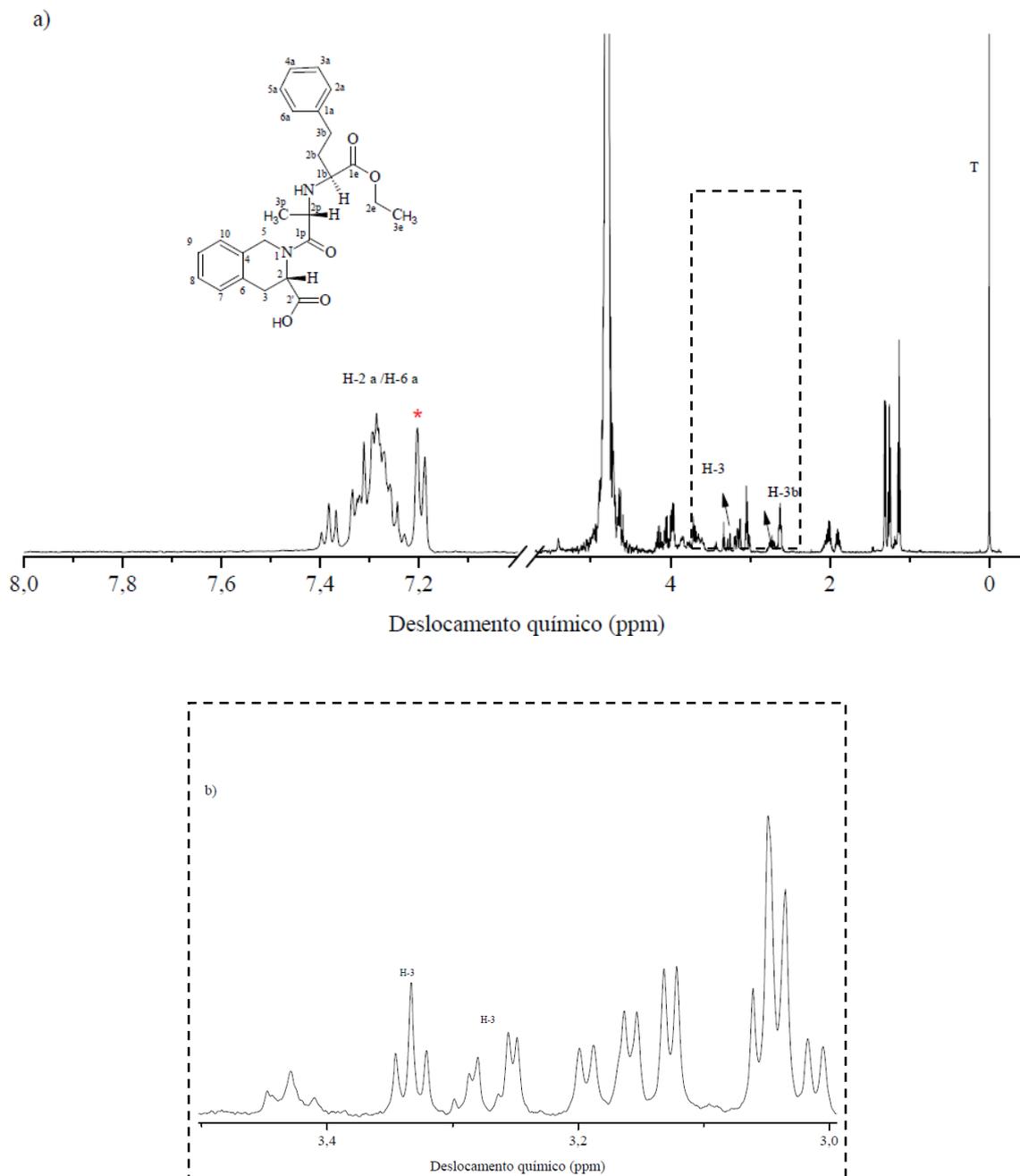
$\delta^1 \text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1 \text{H}$ (Medicamento)
0,54	S	H-18	0,54
0,86	D	H-26 e H-27	-
0,92	D	H-21	0,912
2,17	Ddd	H-1 α	-
2,28	Dd	H-4 β	-
2,40	Ddd	H-1 β	-
2,58	Dd	H-4 α	2,61
2,83	Dd	H-9 β	2,86
3,95	M	H-3 α	-
4,82	T	H-19E	4,82
5,05	D	H-19Z	5,05
6,03	D	H-7	6,05
6,24	D	H-6	6,23

Tabela 9 - Quantidade detectada do ingrediente ativo do medicamento da vitamina D₃ analisada por RMN-¹H.

Medicamento	Vitamina D ₃ (V)
Massa do solvente (mg)	1,2
Massa da piridina (mg)	1,7
Mols de piridina (μmol)	22
Integral (piridina) δ = 8,6	1,3
Integral (S) δ = 0,54	0,01
Razão (V/piridina)	0,008
Quantidade (V) μmol	0,0001
Massa de (V) mg	0,05
Massa do comprimido de V (mg)	235
Massa do comprimido de V pesada	100
Massa de V por comprimido (mg)	0,1
Unidades Internacionais (UI) V por comprimido	4496

O quinapril foi analisado com água deuterada (D₂O) e quase todos os sinais foram observados com exceção dos hidrogênios 2 do medicamento analisados, que devem aparecer em 4,87 ppm, mas que estavam superpostos ao sinal da água (figura 11). A supressão do sinal do solvente não foi realizada, porque apesar do sinal da água ser bem intenso os sinais da amostra do medicamento quinapril apareceram separados no espectro. Os nove hidrogênios da região aromática apareceram devido a uma superposição como um multiplete não resolvido (tabela 10).

Figura 11 – a) Espectro de RMN-¹H do medicamento quinapril em D₂O e em b) região de ampliação de 3,0-3,5 ppm. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do quinapril.



Então, o sinal escolhido para fazer os cálculos de quantificação com o padrão ácido trimetilsililpropanóico (TMSP-Na) foi relacionado ao hidrogênio da região aromática. A quantidade detectada de quinapril no comprimido do medicamento analisado foi de 23 mg (tabela 11). De acordo com a embalagem o medicamento deve conter 20 mg.

Tabela 10- Deslocamentos químicos para o espectro de RMN-¹H do medicamento contendo quinapril em D₂O em comparação com aqueles relatados na literatura (SHEN et al., 2015).

$\delta^1 \text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1 \text{H}$ (Medicamento)
4,9	s	H-2	-
3,3	dd		3,3
3,1	dd	H-3	3,1
2,6-2,9	s	H-3b	2,6-2,6
7,0-7,4	m	H-2a e H-6a	7,2

Tabela 11 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos quinapril analisado.

Medicamento	Quinapril (Q)
Massa do solvente (mg)	1,08
Massa do TMSP-Na (mg)	0,51
Mols de TMSP-Na (μmol)	2,9
Integral (TMSP-Na) $\delta = 0,0$	0,005
Integral (Q) $\delta = 0,54$	0,023
Razão (Q/TMSP-Na)	4,8

Tabela 11 – completa.

Medicamento	Quinapril (Q)
Quantidade (Q) μ mol	14,42
Massa de (Q) mg	6,3
Massa do comprimido de Q (mg)	186
Massa do comprimido de Q pesada	51
Massa de Q por comprimido (mg)	23

O maleato de enalapril também foi analisado com água deuterada (figura 12), com o TMSP-Na como padrão interno. Observa-se no espectro do extrato do medicamento a presença de sinais intensas da lactose 3,5 -3,9 ppm. Para a confirmação dos cinco hidrogênios da região aromática esta região foi integrada e o valor da integral foi dividido por cinco para confirmar a quantidade de hidrogênios aromáticos. Esta região apresentou sobreposição dos sinais. Os sinais de deslocamento químico do medicamento de maleato de enalapril analisado encontra-se na tabela 12. A quantidade detectada de maleato de enalapril no medicamento analisado foi de 3,27 mg em um comprimido (tabela 13), de acordo com a quantidade de 5 mg indicado na embalagem.

Figura 12 – a) Espectro RMN-¹H dos medicamentos do maleato de enalapril em D₂O e b) região de ampliação 2-4,5 ppm (completa). P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do maleato de enalapril.

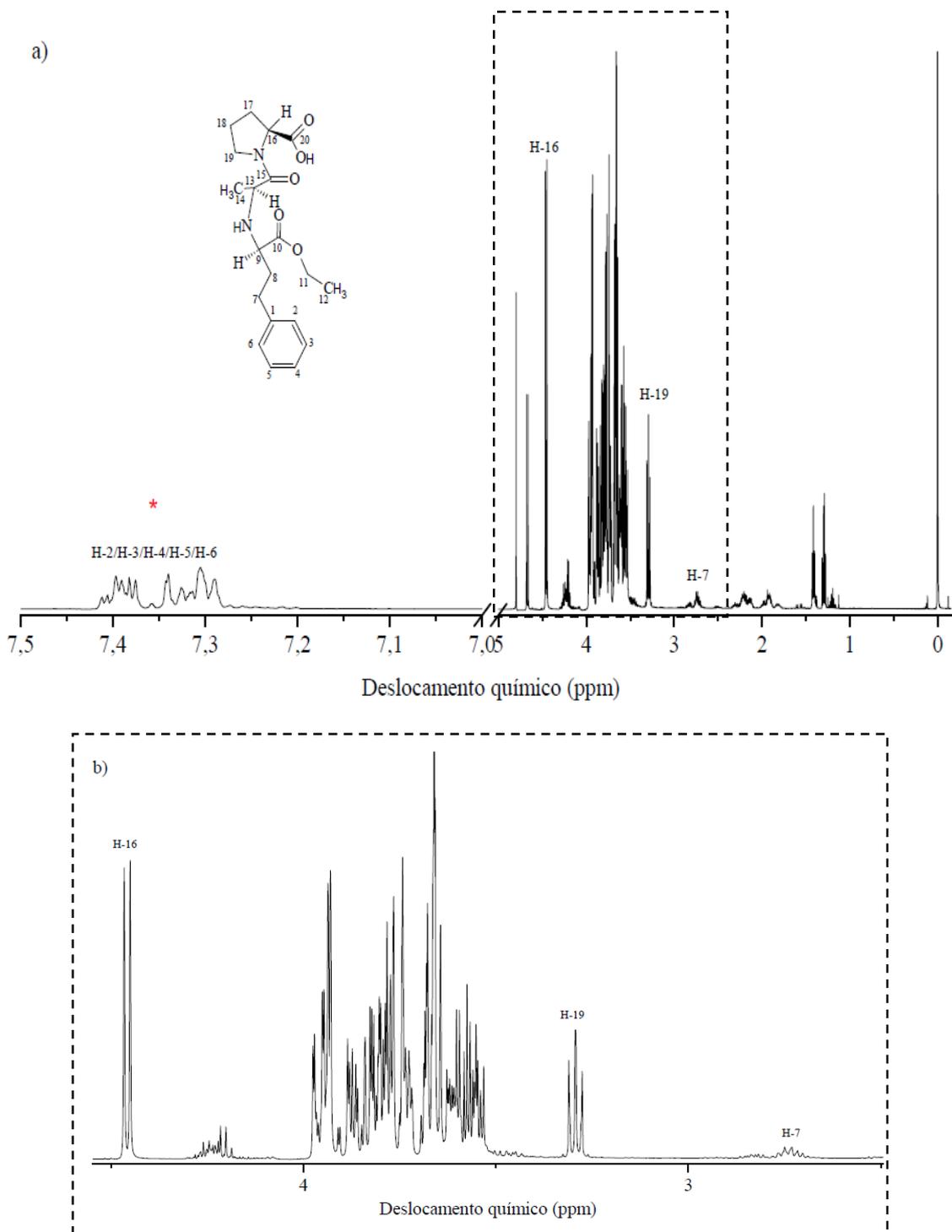


Tabela 12 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H para os medicamentos contendo maleato de enalapril em D₂O em comparação com aqueles relatados na literatura (ALI et al., 2006).

$\delta^1\text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1\text{H}$ (Medicamento)
1,3	t	H-12	-
1,5	d	H-14	-
2,8	m	H -7	2,6
3.4	m	H-19	3,2
3.9	t	H-9	-
4,3	q	H-13	-
4,4	dd	H-16	4,4
7,2	m	H-2/H-4/H-6	7,2
7,3	m	H-3/H-5	7,3

Tabela 13 - Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de maleato de enalapril analisado.

Medicamento	Maleato de enalapril (M)
Massa do solvente (mg)	0,87
Massa do TMSP-Na (mg)	0,42
Mols de TMSP-Na (μmol)	2,4
Integral (TMSP-Na) $\delta = 0,0$	$12,7 \times 10^4$

Tabela 13 – completa.

Medicamento	Maleato de enalapril (M)
Integral (M) $\delta = 7,25-7,33$	$8,3 \times 10^4$
Razão (M/TMSP-Na)	0,65
Quantidade (M) μmol	1,6
Massa de (M) mg	0,67
Massa do comprimido de M (mg)	218
Massa do comprimido de M pesada	45
Massa de M por comprimido (mg)	3,3

O paracetamol foi analisado em DMSO-d₆ e seus sinais podem ser vistos claramente (figura 13) e as atribuições destes sinais são mostradas na tabela 14. O sinal em 6,69 ppm (2H) referente aos hidrogênios 2 e 6 foi escolhido para os cálculos de quantificação. O sinal estava sobreposto ao sinal da piridina que também aparece nesta região. Então, foi necessário subtrair o valor da integral da piridina pelo valor da integral do paracetamol para obter o valor da integral do paracetamol. A quantidade calculada do medicamento de comprimido de paracetamol analisado foi de 655 mg (tabela 15). De acordo com a embalagem o comprimido deve conter 750 mg.

Figura 13 - Espectro de RMN-¹H do medicamento do paracetamol DMSO-d₆. P = piridina e * = Sinal de RMN integrado do paracetamol.

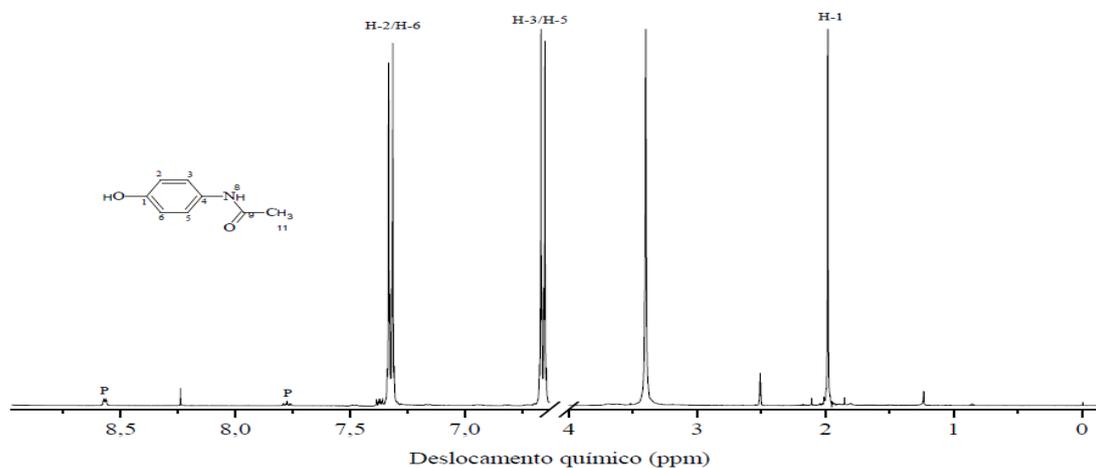


Tabela 14 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H para os medicamentos contendo paracetamol em DMSO-d₆ em comparação com aqueles relatados na literatura (SANTOS et al., 2013).

$\delta^1\text{H}$ (Literatura)	Multiplicidade	Atribuição	$\delta^1\text{H}$ (Medicamento)
1,98	s	H-1	1,98
6,68	d	H-3 e H-5	6,69
7,37	d	H-2 e H-6	7,37

Tabela 15 – Quantidade detectada dos ingredientes ativos dos medicamentos de paracetamol analisado.

Medicamento	Maleato de enalapril (M)
Massa do solvente (mg)	0,87
Massa do TMSP-Na (mg)	0,42
Mols de TMSP-Na (μmol)	2,4
Integral (TMSP-Na) $\delta = 0,0$	$12,7 \times 10^4$
Integral (M) $\delta = 7,25-7,33$	$8,3 \times 10^4$
Razão (M/TMSP-Na)	0,65
Quantidade (M) μmol	1,6
Massa de (M) mg	0,67
Massa do comprimido de M (mg)	218
Massa do comprimido de M pesada	45
Massa de M por comprimido (mg)	3,3

Para avaliar as variações na quantidade determinada do princípio ativo do medicamento de maleato de enalapril através do método proposto replicatas

foram realizadas. Na prática apenas duplicatas são suficientes para determinar discrepâncias produzidas por parâmetros de aquisição ou desvios durante o processo de medição (PAULI et al., 2014), mas para avaliar o processo de medição inclusive os processos de preparo das amostras foram realizados quadruplicatas. Conforme podemos verificar na tabela 16 observamos pequenas diferenças nas quantidades detectadas de maleato de enalapril. Estas diferenças podem estar relacionadas a pequenas diferenças da massa pesada do comprimido ou durante o processamento dos espectros (correção da fase, linha de base ou integração), mas estão dando uma impressão da precisão do processo.

Tabela 16 – Comparação das quantidades detectadas dos ingredientes ativos do medicamento de maleato analisado em quadruplicata.

Medicamento	Maleato 1.1	Maleato 1.2	Maleato 1.3	Maleato 1.4
Massa do solvente (mg)	0,88	0,87	0,87	0,87
Massa da TMSP-Na (mg)	0,42	0,41	0,41	0,41
Mols de TMSP-Na (μmol)	2,4	2,4	2,4	2,4
Integral (TMSP-Na) δ = 0,0	1,3 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁻¹	1,1 x 10 ⁻¹
Integral (M) δ = 7,25-7,33	8,3 x 10 ⁴	8,5 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁻²	6,8 x 10 ⁻²
Razão (TMSP-Na/M)	6,5 x 10 ⁻¹	6,7 x 10 ⁻¹	5,8 x 10 ⁻¹	6,1 x 10 ⁻¹
Quantidade (M) μmol	1,6	1,6	1,4	1,6
Massa de (M) mg	0,67	0,69	0,59	0,68
Massa do comprimido de M (mg)	218	218	218	218
Massa do comprimido de M pesado	45,1	46,7	44,8	48,7
Massa de M por comprimido (mg)	3,3	3,2	2,9	3,0

A média calculada foi de $3,1 \pm 0,17$ e o coeficiente de variação foi de 5,5 % indicando uma boa precisão das medidas. Neste trabalho foi mostrado que uma análise rápida dos medicamentos sem o ajuste dos parâmetros instrumentais para a aquisição dos espectros de RMN-q fornece dados suficientes para avaliar a presença do princípio ativo e determinar aproximadamente se a quantidade do princípio ativo do medicamento corresponde com a descrita no rótulo. Para alcançar maior precisão e acurácia, HPLC ou RMN-q podem ser usados, especialmente quando muitas amostras de um mesmo medicamento precisam ser analisados, mas neste caso tempo precisa ser investido no desenvolvimento de protocolos, o que acaba consumindo muito tempo se comparado às análises de RMN descritos aqui, onde os resultados podem ser obtidos em minutos.

O passo de validação deve ser aplicado se um novo método é estabelecido. A validação é realizada para provar que o método desenvolvido é apropriado para realizar medidas qualitativas e quantitativas e para obter dados acurados (BRASIL, 2010). As regras de validação são estabelecidas de acordo com o Guia Internacional em Harmonização do inglês the International Harmonization Guide (ICH) e do Guia Internacional em Organização para a Padronização do inglês International Organization for Standardization (ISO) (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros para realizar a validação são especificidade, linearidade, acurácia, limites de detecção e quantificação e robustez que devem ser testados para uma validação apropriada (BRASIL, 2010 e SHERMA et al., 2010). Os passos de validação podem ser encontrados em MALZ et al., 2005. Alguns estudos usando RMN para a quantificação de medicamentos já indicam os passos de validação (SANTOS et al., 2013; GADAPE et al., 2011; SELASH et al., 2008).

1.5.2 CÁLCULOS DE SIMILARIDADE PARA O MEDICAMENTO CLORIDRATO DE SERTRALINA

O conceito de similaridade para comparar espectros de RMN, conforme descrito por SCHRIPSEMA (2019) pode servir para entre amostras de medicamentos contendo o mesmo princípio ativo detectar amostras que tem

diferenças na quantidade do princípio ativo ou contem diferenças nos compostos adjuvantes na composição. Os cálculos de similaridade pelo método do *floating bins* foram realizados com as amostras dos medicamentos de cloridrato de sertralina para investigar diferenças na composição química dos medicamentos. De acordo com os dados da tabela 17 de similaridade verificamos que a composição dos medicamentos é bem semelhante, pois a porcentagem de similaridade entre as amostras é alta (S1 e S10 89 %, S2 e S3 94 %, S4 e S2 85 %, S5 e S9 91 %, S6 e S8 92 %, S7 e S8 93 %, S9 e S8 94 %, S10 e S9 92 %).

Se compararmos cada medicamento com o par que possui maior valor de similaridade, por exemplo, S1 com S10 apresenta 89 % de similaridade e os 11 % que diferenciam as duas amostras é devido a três excipientes (hipromelose, corante e carmelose sódica) (anexo 1) que S1 tem e que não estão presentes em S10. O mesmo ocorre com as amostras S2 e S3 que possuem 93 % de similaridade. Os sete por cento que diferenciam S2 de S3 é devido a presença de quatro dos excipientes presentes em S2 (fosfato de cálcio dibásico, polietilenoglicol, polissorbato-80 e laca de índio carmim) e três excipientes presentes em S3 (hiprolose, amido e talco) que não estão na composição de S2. Esta mesma análise se repete para a comparação das demais amostras.

Tabela 17- Tabela de similaridade das amostras de cloridrato de sertralina a partir do método de *floating bins*.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S9.2	S11
S1	100	79,3938	79,6876	79,0981	84,0737	73,0674	84,3439	78,5032	79,2246	87,0998	89,4472
S2	79,3938	100	93,7459	84,9988	91,0267	81,6054	82,743	83,8756	83,2755	86,3464	83,2755
S3	79,6876	93,7459	100	84,1682	91,2488	79,9264	81,5839	83,3229	82,2504	85,8758	83,0927
S4	79,0981	84,9988	84,1682	100	85,1451	79,9633	83,4296	81,8976	83,9676	84,9887	82,924
S5	84,0737	91,0267	91,2488	85,1451	100	83,5323	86,2241	87,0949	87,2153	91,4269	87,857
S6	73,0674	81,6054	79,9264	79,9633	83,5323	100	87,2608	91,8696	91,7465	82,5625	79,5237
S7	84,3439	82,743	81,5839	83,4296	86,2241	87,2608	100	93,1303	92,4446	88,7794	89,4514
S8	78,5032	83,8756	83,3229	81,8976	87,0949	91,8696	93,1303	100	94,2729	86,6313	86,0074
S9	79,2246	83,2755	82,2504	83,9676	87,2153	91,7465	92,4446	94,2729	100	89,0635	86,4355
S9.2	87,0998	86,3464	85,8758	84,9887	91,4269	82,5625	88,7794	86,6313	89,0635	100	92,278
S10	89,4472	83,2755	83,0927	82,924	87,857	79,5237	89,4514	86,0074	86,4355	92,278	100

Desta maneira os medicamentos de cloridrato de sertralina se diferenciam devido à excipiente hiprolose, hipromelose, polietileno glicol, álcool polivinílico, macrogol, talco, polissorbato-80, corante e carmelose sódica de acordo com o anexo I da composição dos excipientes. Todos os medicamentos apresentaram

o mesmo princípio ativo e a composição dos excipientes variou de acordo com a marca do medicamento.

1.6 CONCLUSÕES

De acordo com o protocolo de análise aqui proposto foi possível realizar uma análise semi-quantitativas de seis diferentes medicamentos por ¹H-RMN e avaliar a sua qualidade através da verificação da presença dos ingredientes ativos na quantidade correta deles nos respectivos medicamentos. A quantidade dos ingredientes ativos foi determinada pesando uma massa do comprimido, escolhendo um solvente adequado para a sua solubilização e o padrão interno apropriado para as análises. Logo, este protocolo é válido e serve para analisar outros medicamentos. Assim, a RMN-¹H permite uma extração simples dos ingredientes ativos e uma verificação rápida da sua qualidade, permitindo assim uma triagem inicial dos medicamentos e uma possível falsificação.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.M.; MAHESHWARI, A.; ASMAT, F.; *Complexation of enalapril maleate with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solutions*, **Quim. Nova**, vol. 29, 685-688, 2006.

BHARTI, S.K.; ROY, R.; *Quantitative ¹H RMN spectroscopy*, **Trends in Analytical Chemistry**, vol.35, pp. 2-26, 2012.

BRUICE, P.Y. *Química orgânica*. V.2, 4 ed. São Paulo: Pearson, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA, Resolução RE N° 899 de 29 de maio de 2003, pp.1-15, 2003.

DIGHE, S.V.; *A Review of the Safety of Generic Drugs*, Elsevier, 1999.

DUARTE, C.J.; *Precessão livre de Onda Contínua (CWFP) como ferramenta para supressão do sinal do solvente em RMN de alta resolução*, Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, p.1-13, 2011.

GOROG, S.; *Identification in drug quality control and drug research*, **Trends in Analytical Chemistry**, 2015, 69: 114-122.

GUMIENICZEK, A.; HOPKALA, H.; *High-performance liquid chromatographic assay of quinapril in tablets*, **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 1998, 73:183-185.

HERNANDEZ, P.B.; *UHPLC Determination of Enantiomeric Purity of Sertraline in the Presence of its Production Impurities*, **Chromatographia**, 2014, 77:1315-1321.

HOLZGRABE, U.; MARTINO, M.M.; *Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification – The RMN approach*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011,55: 679-687.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B.; *Quantitative RMN spectroscopy – Applications in drug analysis*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,2005,38: 806-812.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.; *Generic Drug Product Development: International Regulatory Requirements for Bioequivalence*, 2014.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.W.K, WAWER, I.; *RMN spectroscopy in pharmacy*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, 1998, V.17, 557-616.

HOLZGRABE, U.; *Quantitative RMN spectroscopy in pharmaceutical applications*. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, 2010, N° 57, 229-240.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B.; *Quantitative RMN spectroscopy – applications in drugs analysis*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, 2005, N° 38, 806-812.

HOLZGRABE, U.; MARTINO- MALET, M.; *Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification – The RMN approach*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, 2011, N° 55, 679-687.

HUIDOBRO, A.L.; RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C.; *Isolation, identification and determination of the major degradation product in alprazolam tablets during their stability assay*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2006, 44: 404-413.

HELMER, B.; SCHNOES, H.K.; DeLUCA, H.F.; *¹H Nuclear Magnetic Resonance studies of the Conformations of Vitamin D₃ Compounds in Various Solvents*, **Archives of Biochemistry and Biophysics** , 1985, 241:608-615.

JAMES, S. B.; *Applications of RMN to pharmaceutical technology*, **Applied spectroscopy reviews**, 1995, V.30, N° 1 e 2, 119-137.

KARTASHOV, V.S.; *Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control*, **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 1996, V.30, N° 5, 9-62.

MAGGIO, R.M.; CALVO, N.L.; VIGNADUZZO, S.E.; KAUFMAN, T.S.; *Pharmaceutical impurities and degradation product: Uses and applications of RMN techniques*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, 2014: V.101, 102-122.

MIZHIRITSKII, M.D.; KONSTANTINOVSKII, L.E.; VISHKAUTSAN, R.; *2D RMN Study of Solutions Conformations and Complete ¹H and ¹³C Chemicals shift assignments of vitamin D Metabolites and Analogs*, **Tetrahedron**, 1996, 52: 1239-1252.

MALZ, F.; JANCKE, H.; *Validation of quantitative NMR*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol.38, pp.813-823, 2005.

MASSAH, A.R.; GHARAGHANI, S.; LORDEJANI, H.A.; ASAKERE, N.; *New and mild method for the synthesis of alprazolam and diazepam and computational study of their mode to GABAA receptor*, **Med. Chem. Res**, 2016, 25: 1538-1550.

NOVOSELSKY, A.; GLASER, R.; *Solid-state CP/MAS ¹³C studies on conformational polymorphism in sertraline hydrochloride, an antidepressant drug*, **Magnetic Resonance in Chemistry**, 2002, 40:723-728.

PIETERS, L.A.C.; VLIETINCK, A.J.; *Applications of quantitative ¹H- and ¹³C-RMN spectroscopy in drug analysis*, **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, 1989, 7: 1405-1417.

PAULI, G.F.; CHEN, S.N.; SIMMLER, C.; LANKIN, D.C.; GODECKE, T.; JAKI, B.U.; FRIESEN, J.B.; McAlpine, J.B.; NAPOLITANO, J.G.; *Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative ¹H RMN as a Purity Assay*, **Journal of Medicinal Chemistry**, 57, 9220-9231, 2014.

PAIVA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; *Introduction to Spectroscopy*, 3^a ed ,United States, Thomson Learning, 2010.

REYES, R.M.L.; MORALES, G.R.; FERNANDEZ, R.M.; PEREZ, H.R.;

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; *Validação em métodos cromatográficos e Eletroforéticos*, **Quim. Nova**, vol.27, N° 5, pp. 771-780, 2004

SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A.; *Validação de Método Quantitativo Por RMN de ¹H Para Análises De Formulações Farmacêuticas*, **Quim. Nova**, Vol.36, No. 2, pp. 324- 330, 2013.

SCHRIPSEMA, J.; *Application of RMN in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects*, **Phytochemical Analysis**, 2010, 21, 14-21.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; *Metabolomics, Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*, First Edition, 2015.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; *Two-phase Extraction for Comprehensive Analysis of the Plant Metabolome by RMN, Methods and Protocols*, Springer Protocols, 2018.

SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J.G.; McALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; *Universal quantitative RMN analysis of complex natural samples*, **Current Opinion in Biotechnology**, 2014, 25: 51-59.

SHERMA, J.; *Review of HPTLC in Drug Analysis: 1996-2009*, **Journal of AOAC International**, 2010, 93: 754-764.

SHEN, S.; YANG, X.; SHI, Y.; *Application of quantitative RMN for purity determination of standard ACE inhibitors*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; 2015, 114: 190-199.

SINGH, V.D.; DAHARWAL, S.J.; *Development and validation of multivariate calibration methods for simultaneous estimation of Paracetamol, Enalapril maleate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form*, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**: 2017, 71: 369-375.

SALSBURY, J.S.; ISBESTER, P.K.; *Quantitative ¹H RMN method for the routine spectroscopic determination of enantiomeric purity of active pharmaceutical ingredients fenfluramine, sertraline, and paroxetine*, **Magn. Reson. Chem.**, 2005, 43: 910-917.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; *Spectrometric identification of Organic Compounds*, 7^a ed., United States of America, John Wiley e Sons, 1963.

TRABELSI, H.; BOUABDALLAH, S.; SABBAH, S.; RAOUAFI F.; BOUZOUITA, K.; *Study of cis-trans isomerization of enalapril by reversed-phase liquid chromatography*, **Journal of chromatography A**, 2000, 37: 627-630.

TREFI, S.; ROUTABOUL, C.; HAMIEH, S.; GILARD, V.; MALET-MARTINO, M.; MARTINO, R.; *Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis)*

by ¹H RMN, 2D DOSY ¹H RMN and Raman spectroscopy, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 47, pg. 103-113, 2008.

ZOPPI, A.; LINARES, M.; LONGHI, M.; *Quantitative analysis of enalapril by ¹H RMN spectroscopy in tablets*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2005, 37:627.

**CAPÍTULO 2- VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS
FITOTERÁPICOS CONTENDO *PASSIFLORA* ATRAVÉS DA ANÁLISE
METABOLÔMICA E CÁLCULOS DE SIMILARIDADE**

RESUMO SEGUNDO CAPÍTULO

Em medicamentos fitoterápicos a identificação e a quantificação de um composto marcador são parâmetros para determinar a sua qualidade e autenticidade. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi obter a impressão digital de medicamentos fitoterápicos contendo a planta medicinal *Passiflora* através da RMN-H¹ e da HPLC. Na comparação dos espectros foram realizados cálculos de similaridade para investigar se medicamentos de marcas diferentes tem composição similar. Através das análises realizadas por estas duas técnicas foi detectado a presença de dois flavonoides, vitexina e isovitexina nas amostras P2, PR, PK, PP e PE. A quantificação foi realizada pela RMN e as quantidades de isovitexina encontradas foi de 0,03-0,9 mg e de vitexina de 0,06-0,012 mg, valores abaixo dos esperados, de acordo com as quantidades expressas nos respectivos rótulos. Através das análises de PCA verificamos que os medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* mostram a tendência de formar dois grupos de composição química similar PP, PK, PE, PR e PO e P1, P2, P3, P4, P5 e P6. Através dos cálculos de similaridade verificamos que a similaridade das amostras P1, P2, P4 e P5 estava entorno de 70 a 80 %, enquanto a similaridade para as amostras PR, PK, PP, PE e PR variou e 65 a 68%. Assim, verificamos uma boa correlação entre os dados de PCA com os cálculos de similaridade. Através da espectroscopia diferencial foi possível observar que as amostras são bem distintas entre si e que as amostras PP/PE e PK e PP foram as menos distintas. Deste modo não há uma padronização dos medicamentos fitoterápicos com relação a sua composição global e nem com relação a quantidade dos flavonoides que são os compostos bioativos e comumente encontrados em diferentes espécies, e que através da impressão digital e da quantidade de ambos é possível indicar a presença de uma determinada espécie de *Passiflora*.

Palavras-chave: RMN, medicamentos fitoterápicos, autenticidade

2.1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Passiflora* são popularmente conhecidas como maracujá e elas estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais no mundo, onde o Brasil é o maior produtor do fruto de Maracujá e onde há 79 espécies de *Passiflora* (CAZARIN et al., 2014 e ZERAIK et al., 2010). O gênero *Passiflora* está entre os mais usados no consumo de medicamentos fitoterápicos pela população brasileira que devem ser confeccionados a partir das espécies *P. alata* ou *P. incarnata* porque são as espécies oficiais nas Farmacopeias Brasileira e Europeia (ZERAIK et al., 2010). Como os medicamentos fitoterápicos do gênero *Passiflora* são amplamente usados (MIRRODI et al., 2013) eles foram escolhidos como alvo para o estudo metabolômico. Os flavonoides isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina são geralmente considerados como princípios ativos de várias espécies do gênero *Passiflora* (LIANG et al., 2014, FARAG et al., 2016, GADIOLI et al., 2018 e WOSCH et al., 2017). Logo, detectar a presença de tais compostos nos medicamentos fitoterápicos será mais adequada para verificar a qualidade e eventual atividade como também para a avaliação da autenticidade de tais medicamentos (LIANG et al., 2004, GOODARZI et al., 2013 e KUMARI et al., 2013).

Deste modo, foram feitas análises dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* para uma avaliação da qualidade e autenticidade destes medicamentos através da identificação e da quantificação dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina. A impressão digital foi feita através da HPLC e da RMN- ^1H e também os cálculos de similaridade foram realizados com a RMN, pois é uma metodologia recentemente introduzida (SCHRIPEMA et al., 2019), que pode ser usada em vez de análise multivariada dos dados.

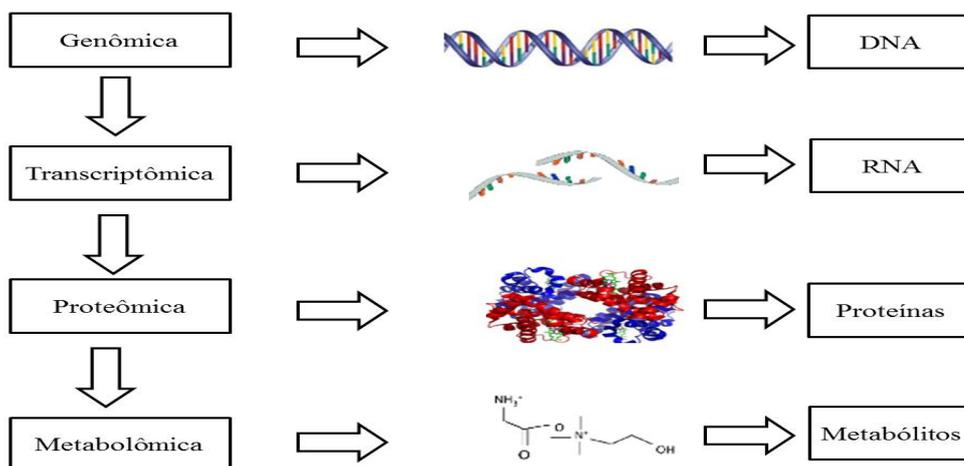
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 METABOLÔMICA UMA VISÃO GERAL

A metabolômica é uma área de pesquisa que tem como objetivo principal identificar e quantificar todos os metabólitos presentes em uma amostra para comparar com outras amostras. Metabólitos são pequenas moléculas que

participam das reações metabólicas muitas vezes essenciais para a manutenção, para o crescimento e para as funções normais de uma célula e que podem ser excretados por um organismo como resposta aos estímulos biológicos, aos fatores ambientais ou à manipulação genética (SCHIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015). Para as plantas metabólitos são divididos em metabólitos primários e secundários, os metabólitos primários estão envolvidos nas funções celulares essenciais para uma planta e os metabólitos secundários apresentam funções específicas e são considerados dispensáveis em muitas condições, mas podem em certas condições serem essenciais para a sobrevivência e reprodução (BOTTGER et al., 2018). O nome metabolômica foi introduzido por Oliver et al. em 1998 baseado em uma analogia com outras ciências ômicas, especialmente genômica, transcriptômica e proteômica (SCHIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015). A genômica estuda o DNA; a transcriptômica estuda o RNA, e a proteômica estuda as proteínas. A figura 1 ilustra estas classes de estudo das ciências ômicas.

Figura 1 - Esquema da hierarquia ômica: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica.



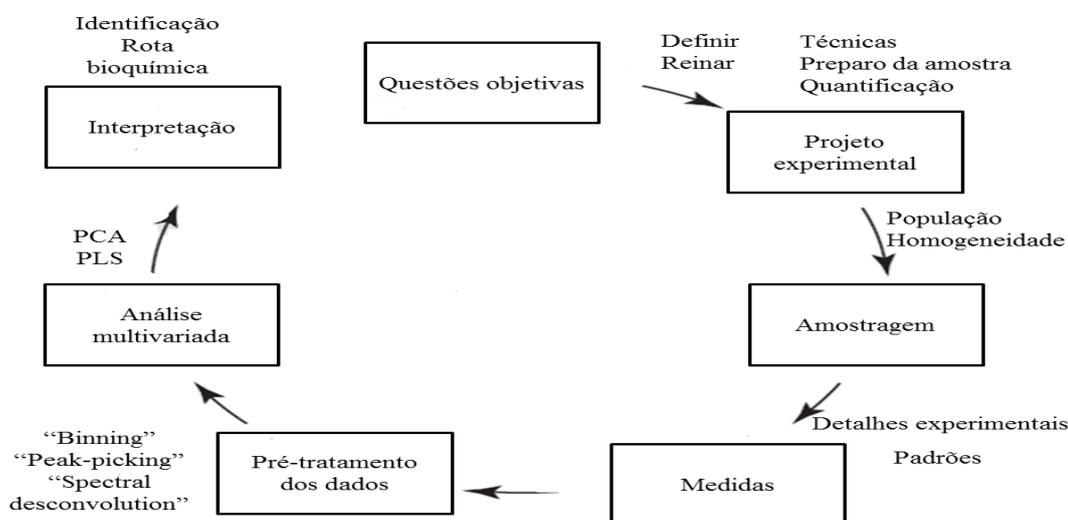
Além dos termos metabolômica, em estudos da metabolômica, podem-se encontrar outros termos específicos da área, como por exemplo, metabonômica que é a medida global dinâmica da resposta metabólica dos sistemas vivos, por um estímulo biológico ou manipulação genética; perfil metabólico que é a análise quantitativa de um conjunto de metabólitos de uma determinada via metabólica ou em uma classe específica de compostos; impressão digital metabólica que é

o escaneamento global para classificar as amostras baseadas nos padrões de metabólitos ou na impressão digital como resposta às doenças, ao ambiente ou à perturbação genética com o objetivo de identificar os metabólitos envolvidos. No perfil metabólico, os grupos ou categorias específicas de metabólitos são definidos para uma quantificação, mas isso gera apenas uma visão limitada do metaboloma total (SCHRIPSEMA et al., 2009).

Em metabolômica o objetivo principal é medir a resposta metabólica dinâmica global de sistemas vivos a estímulos biológicos ou mudança genética. O foco é sobre a compreensão da mudança sistemática através do tempo em sistemas multicelulares complexos. Na verdade, não há diferença entre os termos metabolômica e metabonômica, só que a metabonômica é tradicionalmente mais usado em pesquisa biomédica para descrever a impressão digital de perturbações bioquímicas causadas por doenças, por drogas e por toxinas (SCHRIPSEMA et al., 2009).

No estudo da metabolômica há diferentes etapas. A primeira é definir as questões a serem respondidas e os objetivos do estudo, pois somente quando as perguntas iniciais estão bem definidas os experimentos podem ser planejados de maneira adequada (SCHRIPSEMA et al., 2014). A segunda etapa é o planejamento experimental. Aqui são escolhidas as técnicas a serem usadas, qual o procedimento para preparar as amostras (com ou sem a etapa de extração) e como quantificá-las. A terceira etapa é a realização das análises, onde se deve tomar cuidado com o ajuste do equipamento para obter resultados confiáveis e reprodutíveis. A quarta etapa é o pré-tratamento dos dados para a análise multivariada. A quinta etapa é então a análise multivariada, as formas mais comuns deste tipo de análise são: a análise dos componentes principais (Principal Component Analysis, PCA) e a análise parcial dos mínimos quadrados (Partial Least Squares, PLS). A sexta e última etapa trata da interpretação dos resultados com o intuito de responder às questões inicialmente estabelecidas. Todas essas etapas encontram-se resumidas na figura 2 (SCHRIPSEMA et al., 2015).

Figura 2- Esquema de representação dos experimentos típicos em metabolômica (SCHRIPSEMA, 2015).



Na segunda etapa do estudo da metabolômica como mencionado é necessário realizar um projeto experimental, ou seja, escolher as técnicas a serem usadas para analisar as amostras, onde as técnicas espectrométricas e cromatográficas podem ser combinadas, pois nenhuma delas separadamente é capaz de analisar todos os compostos presentes no metaboloma e a possibilidade de identificar esses compostos deve ser considerado de acordo com a escolha da técnica (SCHRIPSEMA et al., 2015). Estas técnicas podem ser a UV, IR, MS, RMN, cromatografia líquida acoplada a massas (LC-MS do inglês Liquid Chromatography- mass spectrometry), cromatografia gasosa acoplada a massas (GC-MS do inglês gas Chromatography – mass spectrometry) ou cromatografia líquida com RMN (LC-RMN). Mas em metabolômica as principais técnicas usadas para identificação e quantificação são a RMN e a MS acoplada a uma técnica cromatográfica (SCHRIPSEMA et al., 2015 e SCHRIPSEMA et al., 2009).

Logo, em metabolômica o objetivo é identificar e quantificar os metabólitos presentes em um determinado sistema biológico e para isto existem várias etapas. Há também o uso das mais variadas técnicas, principalmente, a impressão digital dos espectros de RMN. Assim o uso destas múltiplas técnicas, todo este planejamento faz da metabolômica uma área de estudo multidisciplinar e complexa. Mas a informação completa dos compostos presentes nas amostras

em metabolômica só é obtida quando há a combinação de todas as técnicas que são escolhidas porque em cada uma delas um tipo diferente de informação é fornecido. A seguir serão abordadas de forma mais detalhada as etapas de estudos em metabolômica (2.2.2).

2.2.2 ETAPAS NO ESTUDO DA METABOLÔMICA

Aqui será discriminada cada uma das etapas do estudo em metabolômica descritas anteriormente e representadas na figura 2. Como mencionado, a primeira etapa é a proposta das questões a serem respondidas e a determinação dos objetivos de estudo e na segunda etapa há a escolha das técnicas de análise. Erros nesta fase levam a experimentos deficientes e dados inconclusivos (SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Na segunda etapa que é o projeto experimental e preparação da amostra deve-se pensar em como preparar a amostra a fim de que ela possa ser submetida às técnicas de análise. Como regra geral, a preparação da amostra deve ser o mais simples possível, pois isto evitará erros e custos. Na metabolômica, o procedimento usual é a extração de metabólitos por solventes ou mistura de solventes de uma determinada matriz. Se as amostras forem preparadas para as análises de RMN solventes deuterados são necessários. Os solventes deuterados comumente usados são metanol, DMSO-d₆, CD₃OD e C₆D₆. Para extratos polares, geralmente usa-se D₂O, CD₃OD-d₄ ou uma mistura dos dois. No entanto um número de fatores deve ser considerado na sua escolha, tais como, a solubilidade dos extratos, se há na literatura espectros obtidos com o mesmo solvente (se mudar o solvente o deslocamento químico muda), o preço dos solventes (D₂O e CDCl₃ são mais baratos, mais metanol deuterado é muito mais caro) e se a amostra é aquosa (talvez ocorra mudança de pH que provoca a variação dos deslocamentos químicos). Outro ponto a ser considerado é a inclusão de um padrão interno (ou padrões internos) e se a concentração do padrão interno é conhecida podem-se realizar medidas quantitativas (SCHRIPSEMA, 2009). O uso do solvente apresenta grande influência nos compostos extraídos. Cada solvente irá fornecer um perfil quantitativo e qualitativo diferente. Também deve levar em consideração a

toxicidade do solvente e a influência dele na análise posterior (SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Considerando a importância do solvente nesta etapa de extração, em metabolômica muito se estuda para encontrar o melhor solvente, a fim de extrair todos os metabólitos ou a maioria deles de uma mesma amostra. Deste modo uma alternativa muito usada é a combinação de solventes como uma maneira de aumentar o número de metabólitos extraídos, porém esta metodologia apresenta grande desvantagem, pois os deslocamentos químicos dependem do solvente e não existe um banco de dados em RMN com misturas de solventes e sim com cada solvente separadamente. Assim esta mistura de solventes dificulta a interpretação dos resultados. E também, por exemplo, se um espectro de uma determinada amostra for obtido por uma mistura de água e metanol, o deslocamento químico será diferente se obtermos o espectro desta mesma amostra com cada um destes solventes separadamente. Para compostos apolares usa-se muito clorofórmio deuterado (CDCl_3) e para compostos polares usa-se frequentemente água deuterada (D_2O). Para uma determinada mistura deve haver um banco de dados específico (SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Levando-se em conta então esse problema da mistura de solventes, foi proposto por SCHRIPSEMA et al., 2015 uma metodologia alternativa para melhorar a etapa de extração foi empregando um sistema de duas fases com água e clorofórmio. Assim dois extratos separados são obtidos e isto apresenta algumas vantagens: os espectros destes dois extratos também são obtidos separadamente e podem ser comparados diretamente com os bancos de dados já existentes. Os dois extratos são complementares e o composto individual extraído dissolve-se em um ou ambos os solventes. De acordo com o que já foi relatado neste sistema raramente foi encontrado o mesmo composto em ambos os solventes. Esta metodologia foi aplicada a amostras de plantas, de biomassa microbiana e de diferentes produtos alimentares, como por exemplo, manteiga (SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Em metabolômica deve-se ter cuidado não somente na etapa da extração e sim em todas as outras etapas que se referem à preparação da amostra, como por exemplo, na transferência de líquidos quando se deseja fazer uma análise quantitativa (muito importante para observar as diferenças entre as amostras).

Esta transferência de líquidos pode aumentar um erro se não houver uma maneira de controle no local. Assim para maximizar a reprodutibilidade todos os volumes transferidos são registrados pela sua massa. A pesagem também é mais acurada se a pipetagem for também mais acurada. Os erros cometidos na transferência de volume podem ser corrigidos se um padrão interno for adicionado a um material a ser extraído e todas as outras quantificações podem ser feitas em relação a este padrão adicionado. No entanto, o padrão interno deve ter o mesmo comportamento que os outros compostos a serem analisados e os extratos contêm uma grande variedade de compostos e o uso do padrão atribui limite de confiança no resultado dos dados (SCHRIPSEMA et al., 2015). Todos estes cuidados foram tomados na preparação das amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora*.

A terceira etapa constituiu-se nas medidas de espectros de RMN e MS ou dos cromatogramas. Em metabolômica a MS é usada como detector dos compostos que são separados na cromatografia gasosa ou líquida. Com o espectrômetro de massas é possível realizar a detecção de 100 compostos em uma única análise (SCHRIPSEMA et al., 2015) GC ou LC. A espectrometria de massas possui alta sensibilidade e limite de detecção. A sua desvantagem constitui-se na quantificação que não é acurada, pois pode haver pequenas diferenças na ionização de um composto dependendo do equipamento usado, além disso, para a quantificação é necessária uma calibração para cada componente (SCHRIPSEMA et al., 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015). A RMN também é usada em metabolômica e ela fornece informações qualitativas e quantitativas simultaneamente, apresenta maior capacidade de quantificação absoluta, de precisão e reprodutibilidade do que MS (SCHRIPSEMA et al., 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015). Assim, em metabolômica o uso de várias técnicas analíticas permite uma análise mais ampla das amostras e o ideal é usar várias técnicas a fim de explorar a vantagem e a desvantagem de cada uma delas (SCHRIPSEMA et al., 2015).

A quarta etapa que constitui no pré-tratamento dos dados. Para os dados de RMN três métodos comuns do pré-tratamento dos dados podem ser diferenciados: “Binning ou bucketing”, “Peak-picking” e “Spectral deconvolution”. No primeiro, o “Binning ou bucketing”, o espectro é dividido em regiões discretas que são integradas individualmente. Este tipo de tratamento é a abordagem mais

comum em metabolômica. No segundo, o “Peak-picking” registra os picos e a intensidade deles ou as integrais, já no terceiro, o “Spectral deconvolution”, o espectro é dividido em seus elementos constituintes num espectro individual da mistura de componentes e cada um deles são identificados e quantificados. Por ser um método simples, o “Binning ou bucketing” são os mais comumente usados (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

A quinta e penúltima etapa é a análise multivariada. A forma mais usada e inicial de análise multivariada é a dos componentes principais (PCA). Nesta análise os sinais que proporcionam o agrupamento das amostras são identificados e assim mostram a variação no conjunto dos dados. Muito cuidado deve ser tomado em relação aos dados provenientes da análise multivariada, uma conferência adequada dos dados deve ser exigida para verificar a validade dos mesmos (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

A sexta e última etapa constitui na interpretação final dos dados e deve envolver a identificação dos compostos que causam as diferenças entre o conjunto de dados. Geralmente é a parte mais complexa no estudo da metabolômica e neste aspecto a RMN apresenta grandes vantagens, porque a estrutura dos compostos pode ser elucidada através dos espectros. Assim, dependendo da natureza da amostra (metabólitos em plantas que são mais difíceis de serem identificados do que em animais) pode ser necessário usar a espectroscopia de outro núcleo, especialmente ^{13}C ou técnicas bidimensionais, tais como: espectroscopia de correlação heteronuclear quantum-múltiplo (HMQC) ou espectroscopia de correlação heteronuclear quantum-único (HSQC) (que mostra a correlação entre átomos de hidrogênio e átomos de carbono que estão ligados), espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) (que mostra a correlação entre dois átomos de hidrogênio acoplados). E as interações espaciais também podem ser analisadas, como por exemplo, com espectroscopia de efeito nuclear overhauser (NOESY), a espectroscopia de correlação heteronuclear de ligações múltiplas (HMBC) (mostra a correlação entre átomos de hidrogênio e átomos de carbono geralmente a duas ou três ligações de distância (deslocamento químicos de ^1H e ^{13}C são as dimensões separadas). Os experimentos HSQC e HMBC possuem informações adicionais sobre o deslocamento químico de átomos de carbono de moléculas que podem ser obtidas. Com estas técnicas geralmente informações suficientes podem ser

obtidas para a identificação de muitos metabólitos primários e secundários se eles puderem ser obtidos em quantidades suficientes para a análise (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

O foco da metabolômica então é a completa análise (qualitativa e quantitativa) de todos os metabólitos presentes em uma amostra e um dos maiores problemas é justamente conseguir analisar todos estes metabólitos. Assim em metabolômica existem várias etapas que são complementares e que devem ser pensadas, pois erros na coleta, na preparação das amostras, no planejamento experimental podem comprometer as últimas etapas (o pré-tratamento dos dados, a análise multivariada e a interpretação dos dados). Isso pode guiar a invalidação dos experimentos ou a resultados não reprodutíveis (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015). Para uma análise baseada no planejamento experimental da metabolômica medicamentos fitoterápicos foram escolhidos para a análise. A seguir será descrito sobre esses medicamentos (2.2.3).

2.2.3 ANÁLISES DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Os medicamentos fitoterápicos incluem ervas, materiais a base de plantas e produtos à base de plantas (KUMARI et al., 2016) e produtos fitoterápicos que tenham em sua composição ingredientes ativos de plantas ou quaisquer outros materiais vegetais ou combinação de materiais vegetais (GOODARZI et al., 2013, XIE et al., 2006), por isto as preparações destes medicamentos são complexas e apresentam uma grande variedade de compostos (LIANG et al., 2004).

Saber a composição química de um medicamento fitoterápico é extremamente difícil, pois a sua composição química pode variar por causa de vários fatores, tais como, espécie botânica usada, a parte da planta usada (semente, folha e raiz), condições de armazenamento, quantidade de sol, umidade, tipo de solo, época da colheita e área geográfica de cultivo. Assim, um fitoterápico pode variar de lote para lote na sua constituição química (GOODARZI et al., 2013). Devido a complexa composição química de um medicamento fitoterápico um composto ou uma classe de compostos que apresenta efeito

farmacológico benéfico para a saúde são considerados como compostos marcadores servindo então para garantir a qualidade e a autenticidade dos medicamentos à base de plantas (GOODARZI et al., 2013 e LIANG et al., 2004).

Os medicamentos fitoterápicos podem ser adulterados e/ou falsificados por causa da escassez das plantas que estão presentes em sua composição e que por isso levam a sua substituição por outras plantas, por misturas de plantas, por substâncias artificiais e por plantas com baixas concentrações dos compostos ativos que também estão presentes na planta que deveria estar na composição original do medicamento fitoterápico. Outros compostos que podem estar dentro dos medicamentos fitoterápicos e que se enquadram em casos de falsificação ou adulteração são os metais pesados, pesticidas e ingredientes orgânicos e inorgânicos que podem ser tóxicos (GOODARZI et al., 2013 e KUMARI et al., 2016).

Levando-se em consideração a complexidade dos produtos à base de plantas, a falsificação e/ou adulteração e a procura cada vez maior por estes produtos como medicamentos, nutracênicos e cosméticos, há a necessidade de padronização de tais medicamentos. A padronização de um medicamento à base de plantas significa tomar cuidado em todas as etapas da fabricação para não haver contaminação e no controle da qualidade que conduz a uma qualidade reprodutível. Significa também garantir que as substâncias com propriedades farmacológicas (substâncias ativas) têm em todos os medicamentos teores correspondentes com a quantidade do material vegetal descrito na bula. Essas substâncias devem estar dentro das concentrações especificadas e a sua quantificação serve como um parâmetro adicional na avaliação da qualidade de um medicamento (KUMARI et al., 2016).

Em geral o controle de qualidade dos fitoterápicos é realizado através da impressão digital dos seus compostos ou da detecção da presença de um composto marcador (KUMARI et al., 2016). A impressão digital é obtida a partir das técnicas cromatográficas como, por exemplo, HPLC TLC, cromatografia em camada delgada de alta eficiência (do inglês High thin layer Chromatography HPTLC e da GC (KUMARI et al., 2016). As impressões digitais cromatográficas têm sido vastamente introduzidas e aceitas pela Organização Mundial da Saúde (WHO do inglês World Health Organization), Organização de Comidas e Medicamentos (FDA do inglês Food and Drug Administration), Comissão da

Alemanha, Associação de Plantas Medicinais da Inglaterra e algumas organizações oficiais e não oficiais como estratégia para avaliar os medicamentos fitoterápicos (FAN et al., 2006).

Deste modo, a impressão digital dos compostos em um medicamento fitoterápico representa uma abordagem qualitativa para a autenticação das espécies de plantas presentes em tais medicamentos (XIE et al., 2006; FAN et al., 2006 e LIANG et al., 2004) que geralmente é realizada através das técnicas cromatográficas, pois é possível separar os componentes individuais da mistura que é um passo muito importante para a identificação e avaliação dos constituintes bioativos (KUMARI et al., 2016).

2.2.4 O GÊNERO *PASSIFLORA*

A família *Passifloraceae* inclui mais de 700 espécies classificadas em 50 gêneros (FARAG, 2016 e INGALE, 2010). A maioria das suas espécies é encontrada nas Américas do Sul e Central., algumas outras são também encontradas na América do Norte, Sudeste da Ásia e Austrália (MIRODDI et al., 2013). A palavra *Passiflora* vem da palavra latina “Passio” porque em 1529 conquistadores espanhóis descreveram as suas flores como símbolo da paixão de Cristo (MIRODDI et al., 2013). Muitas espécies do gênero *Passiflora* são consumidas como maracujá (WOSCH et al., 2017 e SARAVANAN et al., 2014). Muitas espécies, por exemplo, *P. edulis* e *P. laurifolia* são usadas como alimento, pois os seus frutos são comestíveis.

Várias espécies do gênero *Passiflora* apresentam uma longa história de uso tradicional como medicamentos à base de plantas (MIRODDI et al., 2013). As aplicações dos extratos do gênero *Passiflora* têm sido amplamente estudadas e são classificadas em muitas categorias, como por exemplo, ansiolítica, sedativa e narcótica, antioxidante, analgésico, anti-inflamatório e antimicrobiano (FARAG et al., 2016; INGALE et al., 2010; MIRODDI et al., 2013; SARAVANAN et al., 2014; e ZHANG et al., 2013).

A espécie *P. quadrangularis* é usada para tratar picadas de cobra (MIRODDI et al., 2013 e INGALE, 2010); *P. nítida* e *P. palmeri* são usadas pelo seu poder oxidante e a sua atividade antimicrobiana. De todas as espécies do gênero *Passiflora*, a *incarnata* é a mais amplamente usada e possui uma longa

história de uso medicinal para o tratamento da ansiedade e problemas de insônia (FARAG, 2016) e também é utilizada como planta ornamental.

A espécie *P. incarnata* é nativa da América do Norte, mas é cultivada na Europa, Ásia, África e Austrália. Ela é conhecida pelo nome inglês Maypop (MIRODDI et al., 2013). Ela é a mais empregada para o tratamento de insônia, ansiedade e nervosismo e também para a confecção de medicamentos, pois possui em sua composição flavonoides-glicosídeos que apresentam várias atividades biológicas (MIRRODI et al., 2013 e FARAG et al., 2016). Em alguns países apresenta usos mais específicos, como por exemplo, na Índia o seu uso é para tratar a dependência à morfina, na América do Norte para tratar diarreia e queimaduras. No Brasil é especialmente usada como analgésico ou sedativo (MIRODDI, 2013).

Os flavonoides C-glicosídeos são a principal classe de flavonoides encontrados em *Passiflora*, estão presentes em quantidades altas nas diferentes espécies. Conforme a tabela 1 abaixo, os principais flavonoides encontrados são vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina e eles possuem diferenças qualitativas e quantitativas entre as espécies e por isso servem como compostos marcadores que podem ser usados para a diferenciação das espécies de *Passiflora* (GADIOLI et al., 2018 e WOSCH et al., 2017), uma vez que a presença destes compostos é identificada através da análise da impressão digital, pois ela é aceita como uma avaliação qualitativa para a autenticação das espécies de plantas (XIE et al., 2006; FAN et al., 2006 e LIANG et al., 2004)

Os flavonoides que podem indicar a presença da espécie *P. incarnata* e que são considerados marcadores químicos de acordo com WOSCH et al., 2017 são vitexina, isovitexina e isoorientina. Outros flavonoides também já foram relatados na literatura como presentes na espécie *P. incarnata* (tabela 2).

Os flavonoides podem ser classificados de acordo com o estágio de oxidação e com o grau de insaturação do seu anel heterocíclico central. De acordo com a literatura eles podem ser divididos em: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanonois, flavonóis, antocianina e chalconas (VILLIERS, 2016) que podem ser distinguidos de acordo com os seus esqueletos na figura 3 abaixo. Na figura 4 está representado o esqueleto dos flavonoides e os seus substituintes também estão indicados, eles são específicos para cada tipo de flavonoide e são representados para diferenciá-los. Além dos flavonoides outros

compostos também são encontrados, tais como, os alcaloides indólicos representados por harmina, harmano, harmelin, harmol e harmanol presentes em quantidades pequenas. Outros compostos como ácidos fenólicos, ácidos graxos, bem como o ácido fórmico e butírico, cumarinas, fitosteróis e óleos essenciais também estão presentes (CHABARIBERI,2009; MARCHART, 2003; FARAG, 2016, REHWALD,1994 e MIRODDI et al.,2013).

Tabela1 – Flavonoides presentes nas espécies de *Passiflora* que foram relatados na literatura como compostos marcadores das diferentes espécies (WOSCH et al., 2017).

Espécie	Isoorientina	Isovitexina	Orientina	Vitexina
<i>P. actinia</i>	+++	+++	-	+
<i>P. alata</i>	+	+++	+	+++
<i>P. amethystina</i>	+	+++	-	++
<i>P. coccinea</i>	++	+++	-	-
<i>P. cincinnata</i>	+++	++	-	+
<i>P. capsularis</i>	++	+	+++	+
<i>P. edulis f. flavircarpa</i>	++	+++	-	-
<i>P. edulis f. edulis</i>	+	-	-	++
<i>P. incarnata</i>	++	+++	-	+
<i>P. morifolia</i>	++	+++	-	++
<i>P. setacea</i>	++	+++	-	-
<i>P. urnifolia</i>	+	+	-	-

+++ = majoritário, ++= presente em grande quantidade, += presente e - = ausente ou somente traços.

Figura 3 - Representação do esqueleto das classes de flavonoides (VILLIERS et al., 2016).

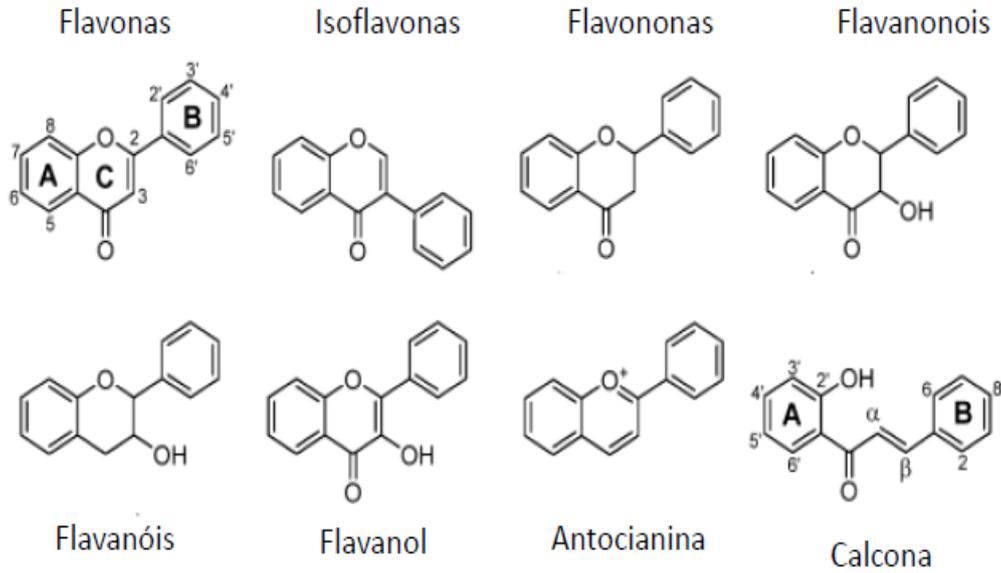


Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.

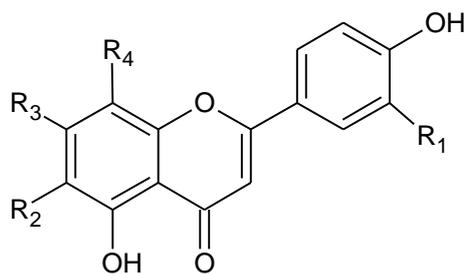


Tabela 2 – Flavonoides relatados na literatura que estavam presentes em *P. incarnata* (MARCHART et al., 2003, FARAG et al., 2016 e GADIOLI et al., 2018).

Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Apigenina	H	H	OH	H
Apigenina-6-C-glucosyl-8-β-O-ribofuranosídeo	H	glc	H	rib
Isoorientina	OH	glc	H	H
Isovitexina	H	glc	H	H
Isoschaftoside	H	ara	H	glc
Isoscoparina-2"-O-β-D-glucopiranosídeo	OCH ₃	soph	H	H
Isovitexina-2"-O-β-D-glucopiranosídeo	H	soph	H	H
Isovitexina- 2"-O-glucosídeo	H	soph	H	H
Isoorientina-2"-O-glucosídeo	OH	soph	H	H
Kaempferol	OH	H	H	H
Lucenina-2	OH	glc	H	glc
Luteolina-6-C-quinovosídeo	OH	qui	OH	H
Luteolina	H	H	OH	H
Orientina	OH	H	H	glc
Swertisina	H	glc	CH ₃	H
Schaftoside	H	glc	H	ara
Saponarina	H	glc	glc	H
Vitexina	H	H	H	glc
Vicenina -2	H	glc	H	glc

Glc: β-D-glucopyranosyl; soph: sophorose, ara: α-L-arabinopyranosyl, rib: β-D-ribofuranosyl e qui: quinose

No gênero *Passiflora* C-glicosídeos são majoritários e constituem 2,5 % dos compostos totais presentes nas folhas de *P. incarnata* (MIRODDI et al., 2013 e CRICE, 2001). Os flavonoides em *P. incarnata* também são considerados seus compostos ativos (CHABARIBERI, 2009) e são marcadores para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos e de plantas medicinais (PEREIRA et al., 2005).

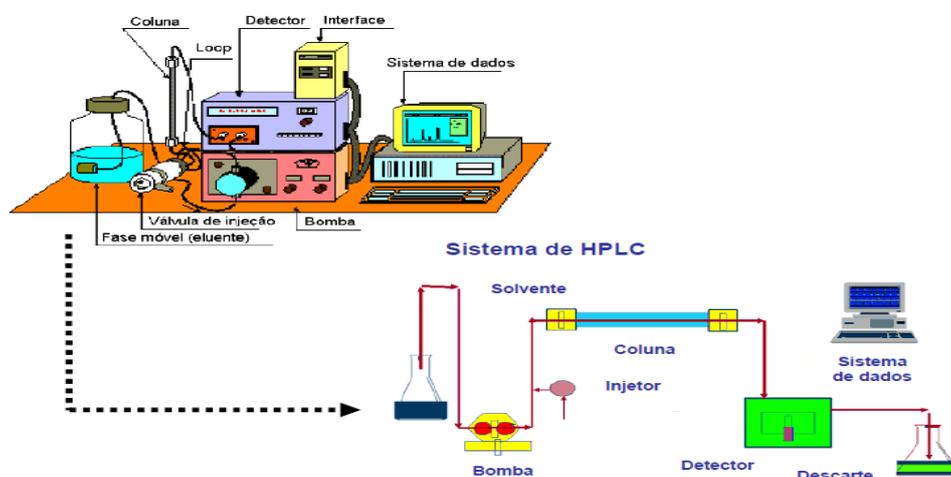
De acordo com o exposto anteriormente conclui-se que os flavonoides são uma importante classe de compostos presentes nas plantas de *Passiflora* que servem para diferenciar as espécies e possuem diversas atividades biológicas, por isso foram escolhidos como compostos alvo para a investigação dos medicamentos fitoterápicos.

2.2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A HPLC é um método de separação físico-químico de substâncias em misturas e é a técnica analítica mais comumente usada para a separação, identificação de compostos (GADIOLI et al., 2018 e THAMMANA, 2016) e também pela vasta aplicabilidade para compostos de grande interesse para a indústria e para a ciência (GADIOLI et al., 2018), pois permite analisar diversas misturas em poucos minutos com alta resolução (JARDIM et al. 2006; DEGANI et al., 1998 e ZOCCOLO et al., 2012) Ela possui a desvantagem de consumir bastante tempo para a otimização dos seus parâmetros instrumentais e análise (HOLZGRABE et al., 1998 e HOLZGRABE et al., 2005).

O sistema da HPLC é composto por reservatório para a fase móvel, bomba, injetor, coluna cromatográfica, detector e frasco coletor de resíduo, conforme a figura 5 abaixo.

Figura 5- Esquema de representação geral de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).



Fonte: <http://graduandosfarmacia.blogspot.com/2014/05/aplicacoes-da-cromatografia-liquida-de.html>, acessado em 20/07/2019.

A fase móvel ou eluente pode ser composta por um solvente ou por uma mistura de solventes orgânicos e (JARDIM et al. 2006; DEGANI et al., 1998 e ZOCCOLO et al., 2012) também uma fase aquosa que pode conter ácidos ou sais para ajudar na separação dos componentes da amostra (THAMMANA, 2016). Ela fica armazenada no reservatório da fase móvel que a mantém livre de gases dissolvidos e deve sempre estar acima do nível da bomba. A bomba apresenta duas funções bombear a fase móvel do reservatório para o injetor e em seguida para a coluna e também manter o fluxo constante sob condições de alta pressão. Existem dois tipos de bombeamento da fase móvel, a primeira onde a fase móvel permanece constante, chamada eluição isocrática, e a segunda onde a composição da fase móvel muda, chamada eluição por gradiente. O injetor introduz a amostra no sistema cromatográfico. A coluna cromatográfica é o local do sistema cromatográfico onde ocorre a separação dos componentes de uma mistura e a sua seleção depende da natureza das substâncias a serem separadas. A fase estacionária é um dos fatores determinantes para a separação dos compostos e o tamanho e a natureza das suas partículas influenciam na separação, pois quanto menor o seu tamanho mais eficiente é a separação. O detector mede uma propriedade física ou físico-química da amostra e envia um

sinal que é diretamente proporcional à concentração da substância na amostra (JARDIM et al. 2006; DEGANI et al., 1998 e ZOCCOLO et al., 2012).

Um tipo de detector DAD (detector de arranjo de diodo) opera na faixa do ultravioleta-visível. Ele possui natureza não destrutiva. Neste detector um feixe de luz na região de 180-800 nm incide em um tubo de quartzo por onde passa a fase móvel e as substâncias ali dissolvidas absorvem a luz em comprimentos de onda específicos. A luz que passa por uma grade de difração tem a sua intensidade medida por um fotodiodo. Quanto maior a concentração do analito, maior a quantidade de luz absorvida. As substâncias que absorvem a luz na região do ultravioleta possuem geralmente elétrons π , elétrons desemparelhados, dupla ligação adjacente a átomos que contém elétrons desemparelhados (-C=C-X), compostos que contém bromo, iodo ou enxofre, grupo carbonila (-C=O), grupo nitro (-NO₂), íons inorgânicos (Br-, I-, NO₃-, NO₂-) e duas ou mais duplas conjugadas (-C=C-C=C-). O frasco coletor de resíduos tem a função de coletar o solvente descartado e o dispositivo de leitura foi onde os dados ficaram armazenados o que permitiu a leitura dos mesmos (ZOCCOLO, 2012; DEGANI et al., 1998, PASSONI, 2014 e JARDIM, 2006). O detector DAD foi escolhido neste trabalho porque é o mais usado para a detecção de flavonoides que foram os compostos escolhidos para a análise. Metade do número total de trabalhos que identificam compostos fenólicos em *Passiflora* usam HPLC-DAD (GADIOLI, 2018).

Neste estudo as análises de HPLC foram realizadas inicialmente para a verificação da presença dos flavonoides nos extratos de *Passiflora*, porém as análises de RMN também foram usadas devido a sua capacidade de analisar misturas complexas e detectar todos os compostos simultaneamente permitindo a sua identificação sem a necessidade de separação. Uma discussão detalhada desta técnica e das suas aplicações para a análise de medicamentos, assim como para uma análise quantitativa já foram abordados no primeiro capítulo desta tese. Assim, a análise de RMN foi escolhida como outra técnica para investigar a impressão digital dos medicamentos fitoterápicos. Com a RMN cálculos de similaridade foram realizados a fim de determinar a similaridade das amostras conforme será abordado no item 2.2.6 a seguir.

2.2.6 SIMILARIDADE PARA COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS

A similaridade é um parâmetro estatístico calculado para avaliar a similaridade ou a dissimilaridade entre duas impressões digitais, assim a amostra é comparada com outra amostra ou com várias amostras ou até mesmo com um padrão que pode ser a média de todas as amostras (GOODARZI et al., 2013). A similaridade serve para encontrar padrões de similaridade em um conjunto de dados (RÁCZ et al. 2018).

Os cálculos de similaridade podem ser realizados de diversas formas, tais como: coeficiente de correlação, coeficiente de congruência, distância euclidiana, distância euclidiana quadrada, índice de similaridade, coeficiente de correlação linear entre outros (GOODARZI et al., 2013). O cálculo da similaridade também pode ser realizado através do somatório da diferença absoluta de cada par de dados, dividido por dois e subtraído por um, conforme as fórmulas na figura abaixo 6 (SCHRIPSEMA, 2019).

Figura 6 – Fórmula para o cálculo de similaridade.

$$\text{Similaridade} = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n |S1 - S2|}{2} \right) \text{ ou } \frac{\sum_{i=1}^n (\text{Min}(S1, S2))}{n}$$

Este cálculo foi introduzido para uso com os dados de RMN. Eles podem refletir qualquer diferença em um conjunto completo de dados (SCHRIPSEMA, 2019). Os cálculos de similaridade proposto por Schripsema, 2019 são úteis para a avaliação dos dados, pois podem sinalizar problemas com o alinhamento dos espectros, problemas com a fase ou com a correção da linha de base, verificar a reprodutibilidade de um experimento, ou seja, conferem qualquer procedimento com relação ao pré-tratamento dos dados a fim de melhorá-los e ajudar na classificação da similaridade das amostras (SCHRIPSEMA, 2019). Eles podem ser usados como uma ferramenta de rotina para a análise metabolômica como outra forma de fazer a comparação das amostras ao invés da análise multivariada, como é rotineiramente usada (SCHRIPSEMA, 2019), pois nas análises multivariadas (PCA ou HCA) os sinais analíticos obtidos das respectivas técnicas de análise, sem a informação estrutural química dos compostos, são usados para separação ou o agrupamento das amostras,

permitindo a sua classificação em grupos similares e o único pré-tratamento dos dados que eles sofrem é geralmente o binning (RÁCZ et al., 2018). O binning consiste em cortar os espectros em pedaços com uma largura entre 0,04-0,05 ppm. Este é um método padrão que é comumente usados em estudos metabolômicos, mas que gera uma redução do número de pontos no espectro. Isso acarreta em perda na informação dos espectros, porque as informações referentes aos picos pequenos são perdidos e os picos podem mudar de um bin para o outro se eles estiverem próximos dos limites do bin. O método do bin é amplamente usado porque era a forma mais adequada para reduzir os efeitos de pequenas das variações de deslocamentos químicos, por exemplo por diferenças de pH (SCHRIPSEMA et al., 2019).

No entanto, nos cálculos de similaridade propostos por Schripsema, 2019 usa-se o método do *floating bins* para comparar amostras e não ter influência de pequenas variações nos deslocamentos químicos, com *floating bins* a média é calculada ao redor de cada ponto. O *floating bins* tem a mesma largura do bin, porém a estrutura do espectro é melhor preservada e o número total de pontos não é reduzido. O tamanho do bin é de 150 pontos que corresponde a 0,046 ppm, mas com o *floating bins* cada ponto foi tomado para o centro do bin, assim não há a redução do número de pontos, na verdade é uma média do sinal. E é muito mais eficiente na remoção de pequenos problemas de desalinhamento sem perder a forma original dos sinais (SCHRIPSEMA, 2019).

Deste modo com os *floating bins* é a forma mais adequada para realizar os cálculos de similaridade das amostras eliminando a influência de pequenas variações no deslocamento químico que são causadas por condições não controladas, tais como, pH, concentração e temperatura. Outras variações são eliminadas, tais como, variações na fase do pico e problemas de shimming, ou seja, qualquer melhora no alinhamento dos espectros irá refletir na melhoria dos cálculos de similaridade (SCHRIPSEMA, 2019).

Assim, os cálculos de similaridade usando o método do *floating binning* podem ser usados para encontrar os padrões de similaridade em um conjunto de amostras em metabolômica, como uma alternativa as análises multivariadas e juntamente com a impressão digital dos compostos podem ser usadas para a avaliação da qualidade de amostras.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram analisadas onze amostras contendo extratos da planta do gênero *Passiflora* por HPLC e RMN. A informação detalhada dos extratos das plantas presentes nas amostras dos medicamentos fitoterápicos encontra-se na tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Composição dos extratos das plantas presentes nos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* analisados.

Nome descrito no rótulo do medicamento fitoterápico	Código	Composição
<i>Passiflora</i>	P1	Desconhecida
<i>Passiflora</i>	P2	Desconhecida
Fibras de maracujá	P3	Desconhecida
<i>Passiflora incarnata</i>	P4	Desconhecida
<i>Passiflora</i>	P5	Desconhecida
<i>Passiflora</i>	P6	Desconhecida
Serenus	PE	<i>P. incarnata</i> , <i>C. oxyacantha</i> e <i>S. Alba. L.</i>
Seakcalm	PK	<i>P. incarnata</i>
Sominex	PO	<i>P. incarnata</i> , <i>C. oxyacantha</i> e <i>V. officinalis</i>

Tabela 3 – completa.

Nome descrito no rótulo do medicamento fitoterápico	Código	Composição
Ritmoneuran	PR	<i>P. incarnata</i>
Pasalix	PS	<i>P. incarnata, C. oxyacatha e S. Alba. L.</i>

Os medicamentos PE, PO e PS são misturas de extratos de plantas, assim PE é composto pelas plantas *P. incarnata, C. oxyacatha e S. Alba. L.*, PO tem em sua composição as plantas *P. incarnata, C. oxyacatha e V. officinalis* e PP tem as plantas *P. incarnata, C. oxyacatha e S. Alba. L.*

2.3.1 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS PARA A ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H)

Primeiro um comprimido ou uma cápsula do respectivo medicamento fitoterápico foi pesado e sua massa foi registrada. Em seguida o comprimido ou o conteúdo da capsula foi pulverizado em um almofariz. Depois mediu-se 100 mg da massa do comprimido pulverizado e foi colocado em um tubo eppendorf de 1,0 mL. Com uma pipeta automática foi adicionado 0,80 mL de metanol deuterado com TMS dissolvido. O volume do solvente transferido foi pesado. A extração se deu por vortex por 15 s, banho ultrasônico por 10 min e centrifugado por mais 10 min. Foi retirado 0,50 mL do sobrenadante e transferido para um tubo de RMN com uma pipeta volumétrica. O volume do líquido do sobrenadante

transferido foi pesado. Um esquema geral das etapas de extração encontra-se na figura 7 e uma foto das amostras preparadas encontra-se na figura 8.

Figura 7- Esquema do protocolo de análise e extração das amostras (SCHRIPEMA et al, 2018).

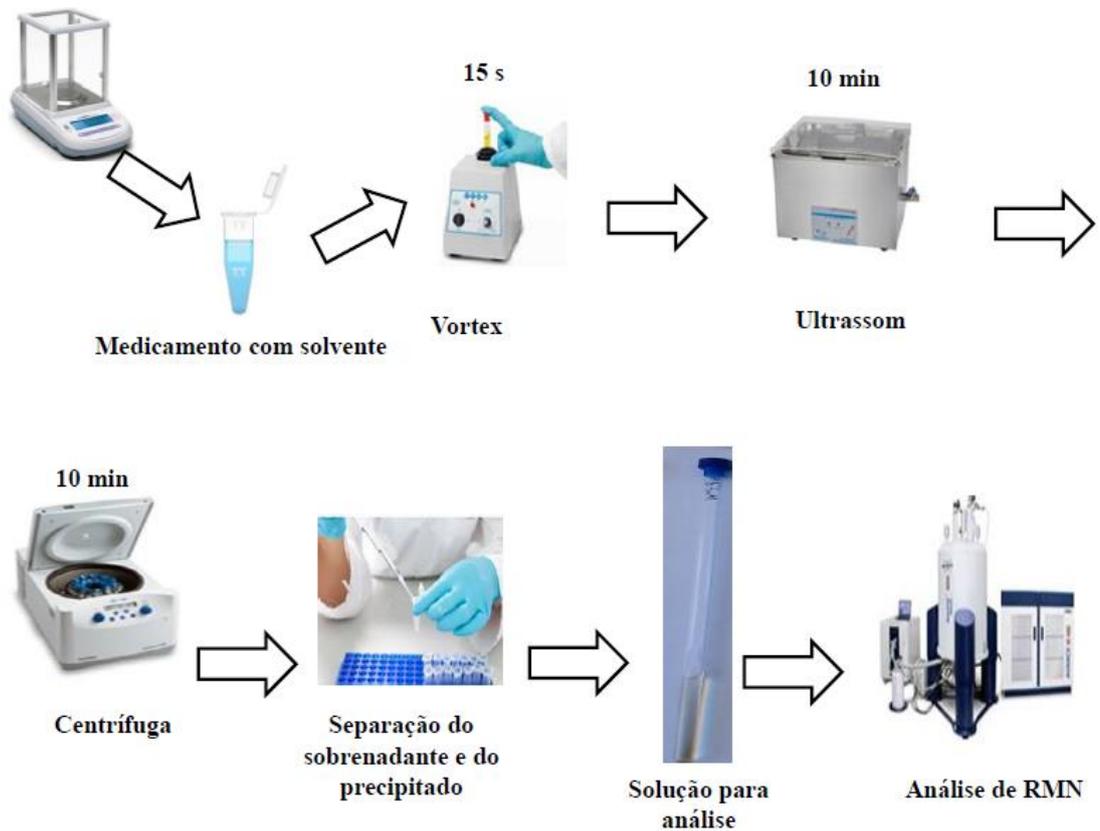
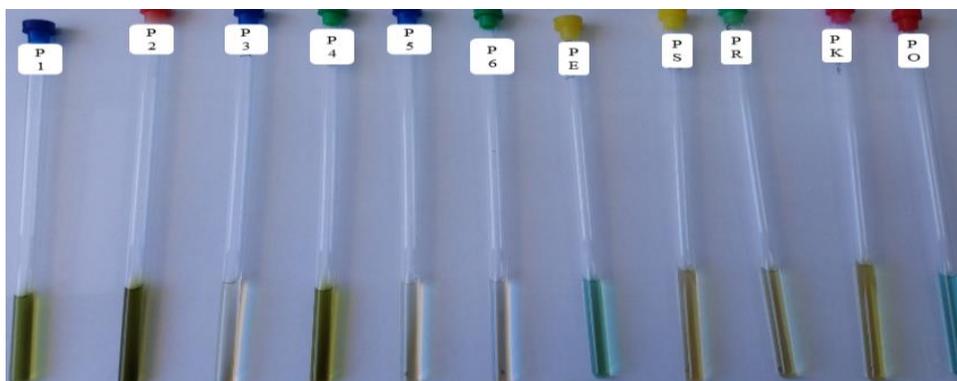


Figura 8- Amostras contendo *Passiflora* analisadas por RMN.



2.3.1.1 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H)

Os espectros de RMN-¹H foram gravados em um espectrômetro BRUKER Avance III HD operando com frequência de 500 MHz para ¹H. Os espectros foram registrados a 25°C com o programa de pulso padrão de Zg 30, com um tempo de aquisição de 2,6 segundos e com um tempo de relaxamento de 4 s adquirindo 64 K pontos de dados. 100 scans foram registrados.

Os espectros de ¹RMN-H foram processados no software Delta RMN v 5.0.2 (Jeol Ltd., USA). O FID foi multiplicado com a função Exponencial, com uma LB de 0,2 Hz. A fase foi ajustada manualmente. O espectro foi calibrado para o sinal do solvente e então a correção da fase foi realizada manualmente. Os pontos de dados foram exportados para o programa OriginPro 8.5.1 para a confecção dos espectros.

2.3.1.2 PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN-¹H PARA A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Para a obtenção do bin de todos os pontos dos espectros de RMN o software SpinWorks 4 vs. 4.2.4 (Kirk Marat, University of Manitoba) foi usado para o ajuste da linha de base, da fase e a calibração do espectro para o sinal do solvente. Os dados então foram importados para uma planilha de Excel (Microsoft Excel 2010). Posteriormente foram normalizados pela soma e importados no software SIMCA para a sua análise.

2.3.1.3 PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN-¹H PARA OS CÁLCULOS DE SIMILARIDADE

Os espectros foram tratados no software SpinWorks 4 vs.4.2.4 (Kirk Marat, University of Manitoba). Os FIDs foram multiplicados por uma função Exponencial com um alargamento (LB) de 0,2 Hz para os espectros de ¹RMN-H. Primeiramente a fase foi ajustada manualmente e depois a linha de base foi corrigida automaticamente. Em seguida o espectro foi calibrado usando o sinal

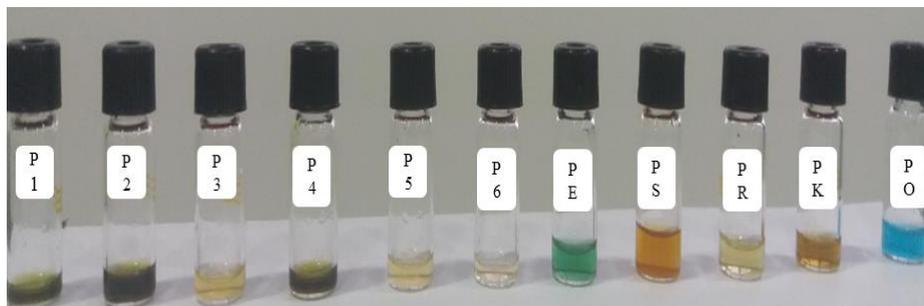
do solvente. Os conjuntos de pontos dos espectros foram exportados para o Excel (Microsoft Excel 2010).

No Excel os espectros individuais foram reduzidos para a região entre 10,01 a -0,15 ppm. Os sinais do solvente foram removidos no espectro de hidrogênio, logo, a região de 3,33 a 7,22 ppm foi ajustada para zero. Fez-se a soma de todos os pontos do espectro e posteriormente fez-se a normalização. Os espectros foram alinhados em relação ao espectro médio pelo cálculo de similaridade. Posteriormente a soma de todos os pontos foi recalculada e ajustada para obter uma soma total de exatamente 1. Assim, os dados foram usados para os cálculos de similaridade por *floating bins*.

2.3.2 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS PARA A ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Primeiro um comprimido do respectivo medicamento fitoterápico foi pesado e sua massa foi registrada. Em seguida o comprimido foi pulverizado em um almofariz e novamente a sua massa foi registrada. Depois mediu-se 150 mg da massa do comprimido e foi colocado em um tubo eppendorf de 1,0 mL. Com uma pipeta automática foi adicionado 0,5 mL de metanol. A extração se deu por vortex por 15 s, banho ultrasônico por 10 min e centrifugado por mais 10 min, conforme o esquema representado na figura 7, essa extração foi realizada de modo similar ao que foi feito para as análises de RMN. A amostra então foi transferida para um vial de 2 mL e levada para a análise. Uma figura das onze amostras preparadas para a análise de HPLC encontra-se na figura 9.

Figura 9 – Medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* analisados por HPLC.



As análises por HPLC foram realizadas em um equipamento DIONEX Ultimate 3000 e com uma coluna LiChrospher 60RP select B, C-18 (125 x 4.0 mm, 5µm). Os dados de UV foram adquiridos usando um detector de arranjo de diodo (DAD). A fase móvel consistiu no solvente A (0,2 % de ácido fórmico em água) e no solvente B (acetonitrila). As separações foram realizadas usando a eluição isocrática de 11 % de B e 89 % de A. O fluxo da fase móvel foi de 1 ml/min. O volume de injeção das amostras foram de 5 µL assim como para os padrões de flavonoides. Os dados foram processados no software Chromelon Chromatography Cata System (Thermo Fisher Scientific).

2.3.3 CÁLCULOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES PRESENTES NOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO *PASSIFLORA*

A massa de um comprimido do medicamento fitoterápico foi de 280 mg e foi pesado 100 mg dessa massa em um eppendorf de 2mL. Em seguida foi acrescentado 100 µL do solvente, metanol deuterado. Uma outra solução de 100 µL de metanol deuterado com 700 µL do padrão interno piridina dissolvido foi preparada separadamente para quantificação usando o padrão externo (seu espectro encontra-se no anexo). Nesta solução foi possível obter a massa da piridina através da sua densidade (1,05 g/cm³) o que correspondeu a 105 mg. Com esta massa e com a sua massa molecular (432,58 mols/g) foi possível obter o seu número de mmols (1,39 x 10⁻⁴) da piridina. Então, o sinal da piridina em 8,6 ppm (2H) foi integrado (0,08658). O sinal da isovitexina em 7,9 ppm também foi integrado (0,05343). Os sinais da isovitexina e da piridina foram escolhidos

para a integração devido a não sobreposição com outros sinais nos seus respectivos espectros que foram obtidos separadamente. A seguir a razão da integral da isovitexina e da piridina (R1) foi obtida (0,6171). A razão (R2) do número de hidrogênios da piridina e da isovitexina foi obtida. A razão (R3) da massa do comprimido em relação a massa pesada do comprimido foi obtida. Assim, todas as razões foram multiplicadas com a massa molecular da isovitexina a fim de obter a sua massa no comprimido analisado. O passo a passo destes cálculos encontra-se abaixo:

$$Q_{\text{(isovitexina /comprimido)}} = n_{\text{(piridina)}} \times \frac{I_{\text{iso}}}{I_{\text{p}}} \times \frac{H_{\text{p}}}{H_{\text{iso}}} \times MM_{\text{(isovitexina)}} \times \frac{P_{\text{c}}}{M_{\text{p}}} = 0,95 \text{ mg}$$

$$n_{\text{(piridina)}} = 0,105/79 = 0,6171$$

$$R1 = \left(\frac{I_{\text{v}}}{I_{\text{p}}}\right) = \left(\frac{\text{integral da isovitexina}}{\text{integral da piridina}}\right) = \frac{0,054}{0,086} = 0,617$$

$$R2 = \left(\frac{H_{\text{p}}}{H_{\text{s}}}\right) = \left(\frac{\text{número de hidrogênios da piridina}}{\text{número de hidrogênios da isovitexina}}\right) = \frac{2}{1} = 2$$

$$MM_{\text{(isovitexina)}} = \text{massa molecular da isovitexina} = 432,58$$

$$R3 = \left(\frac{P_{\text{c}}}{M_{\text{p}}}\right) = \frac{\text{massa do comprimido}}{\text{massa do comprimido pesada}} = \frac{208}{104} = 2$$

O mesmo cálculo foi realizado para a quantificação da vitexina.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 DETECÇÃO DOS FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As amostras dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* foram analisadas por HPLC e elas foram preparadas em metanol, pois o metanol é o solvente mais usado para a extração de compostos fenólicos em folhas, polpas e cascas de plantas (GODIOLI et al., 2018) e os compostos fenólicos de interesse neste estudo foram os flavonoides. As medidas de HPLC também foram realizadas para obter a impressão digital cromatográfica das amostras, pois esta proporciona uma avaliação qualitativa dos medicamentos além de

proporcionar a separação dos compostos presentes (XIE et al., 2006, FAN et al., 2006 e LIANG et al., 2014).

A separação dos flavonoides foi realizada por cromatografia de fase reversa (RP-LC), pois foi indicado pela literatura como um método quase que exclusivo para a análise destes compostos. A coluna de sílica gel octadecil (C18) é a mais usada e por isso foi escolhida para a análise (VILLIERS et al., 2016).

Nos cromatogramas das amostras de medicamentos fitoterápicos P3, P5, P6 e PO não foram observados picos nos cromatogramas que exibissem espectros de UV, e na amostra P1 não foram observados picos que exibisse espectro de UV de flavonoide e na amostra P4 foram observados dois picos nos cromatogramas que exibiram espectros de UV que podem ser de outros flavonoides que não foram os flavonoides investigados, para os medicamentos PK, P2, PR, PS e PE (figuras 10- e 11) foram observamos picos nos cromatogramas que exibiram espectros de UV com duas bandas nesta região banda I: 330-340 nm referente ao anel B e banda II: 260-272 nm referente ao anel A característicos de flavonoides (GADIOLI, et al., 2018 e VILLERS et al., 2016). Assim, o espectro de UV permitiu determinar a classe de compostos presentes nos medicamentos, pois o espectro de UV-VIS foi característico de flavonoides. A detecção por UV-VIS é uma abordagem usada, pois é um método barato e comumente disponível (VILLIERS et al., 2016).

De acordo com a comparação dos tempos de retenção dos picos nos cromatogramas e dos espectros de ultravioleta-visível dos padrões de flavonoides (tabela 4 e figura 12) foi possível identificar os flavonoides isoorientina (P2), vitexina e isovitexina (PK e PR), vitexina (PS) e isovitexina (P2 e PE) nos medicamentos contendo *Passiflora*. Conforme podemos verificar nos seus cromatogramas e seus espectros (fig.11) e na tabela 5 com os respectivos valores de tempo de retenção (T_r) e comprimento de onda (λ) para cada um dos medicamentos.

Figura 10 – Cromatogramas dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* sem a presença dos flavonoides investigados, em a) e b) possíveis flavonoides presentes na amostra.

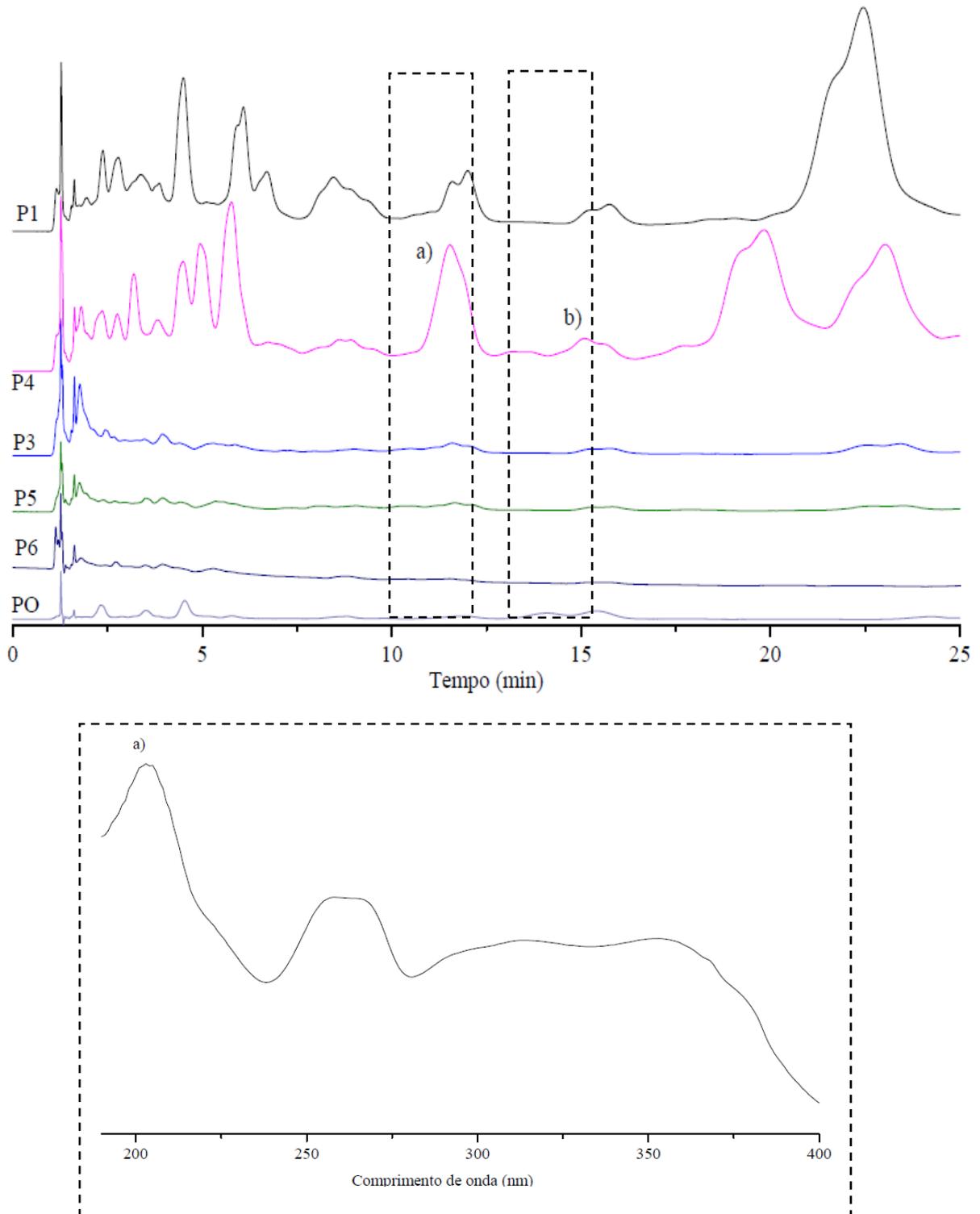


Figura 10- completa.

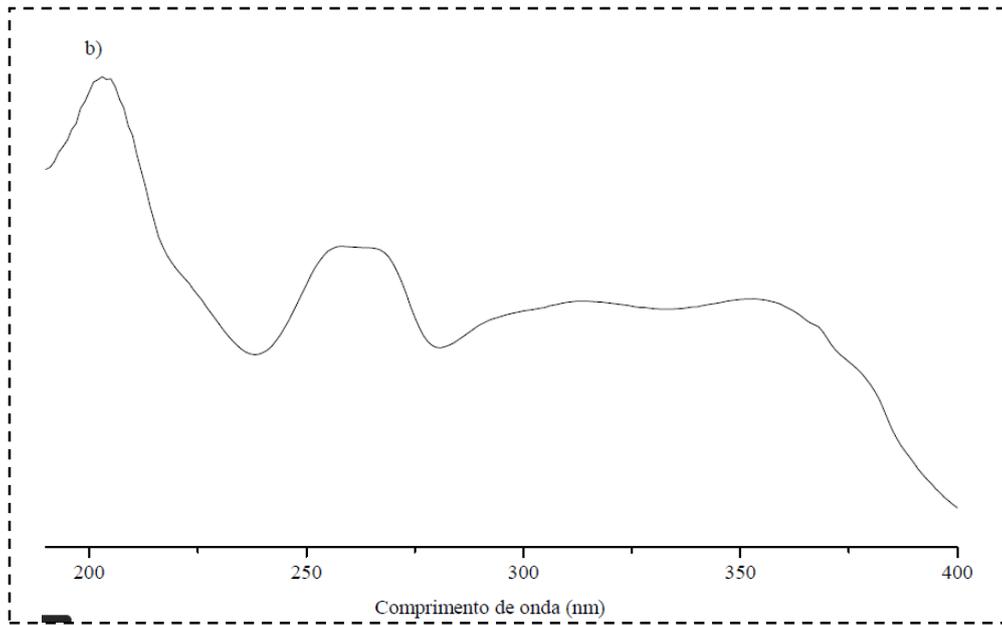


Figura 11 – Cromatogramas das amostras de medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* com a presença de flavonoides e em a) o espectro de UV da isovitexina, em b) da vitexina e em c) da isoorientina.

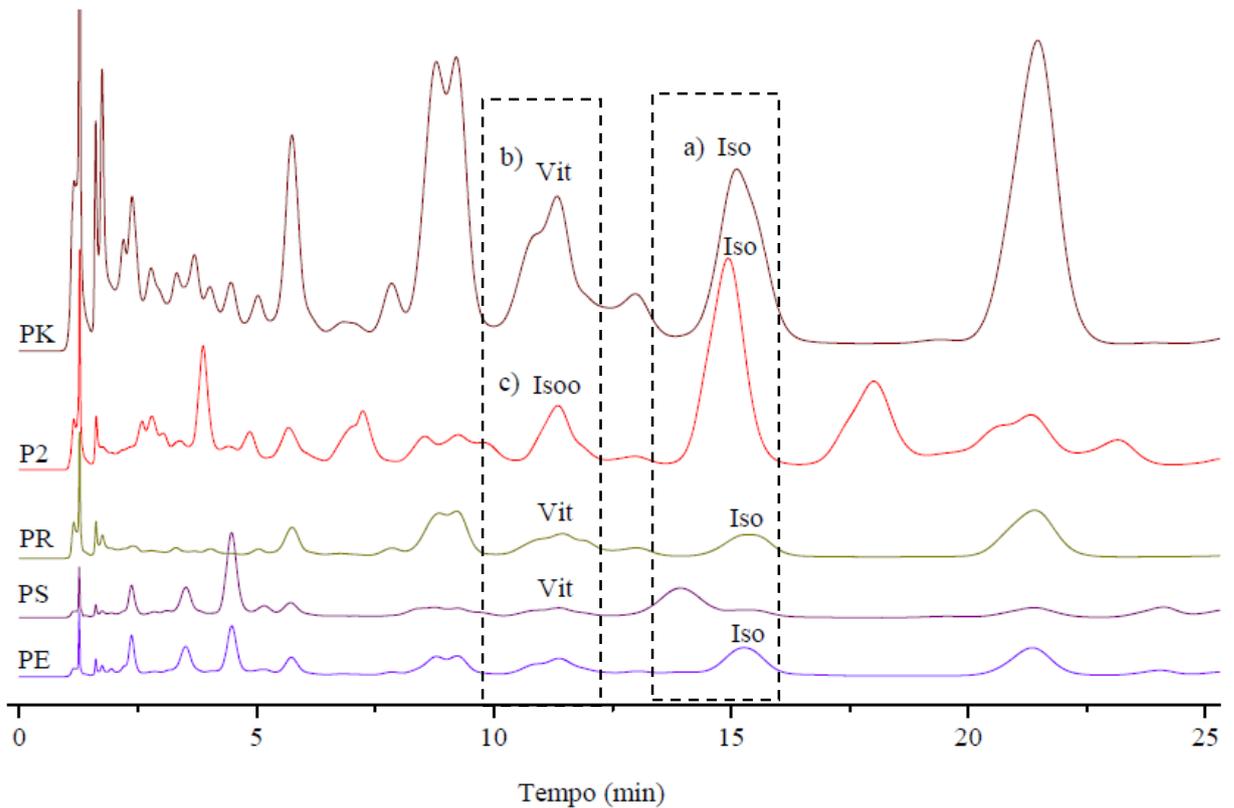


Figura 11- completa.

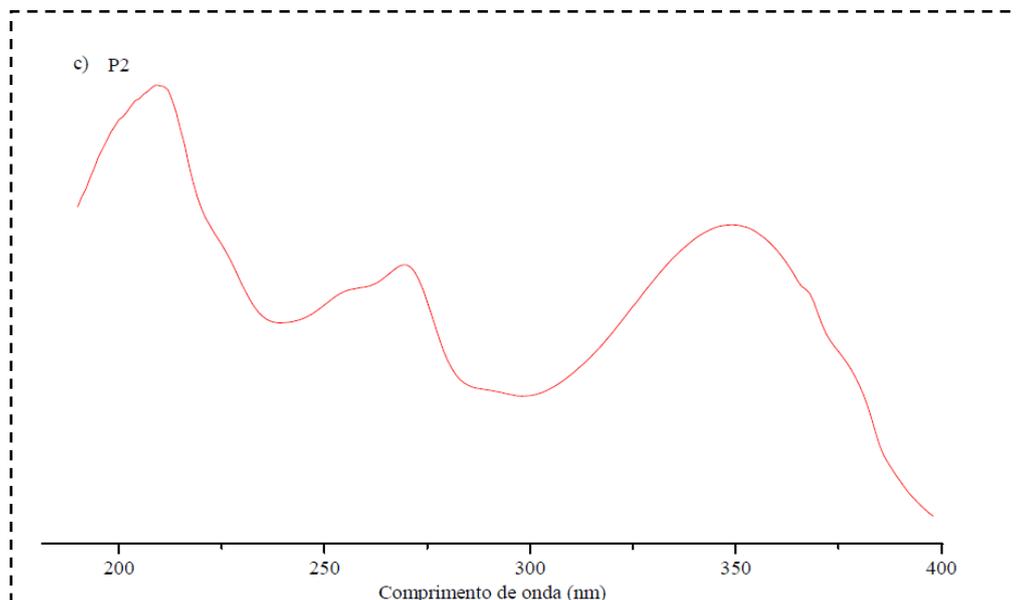
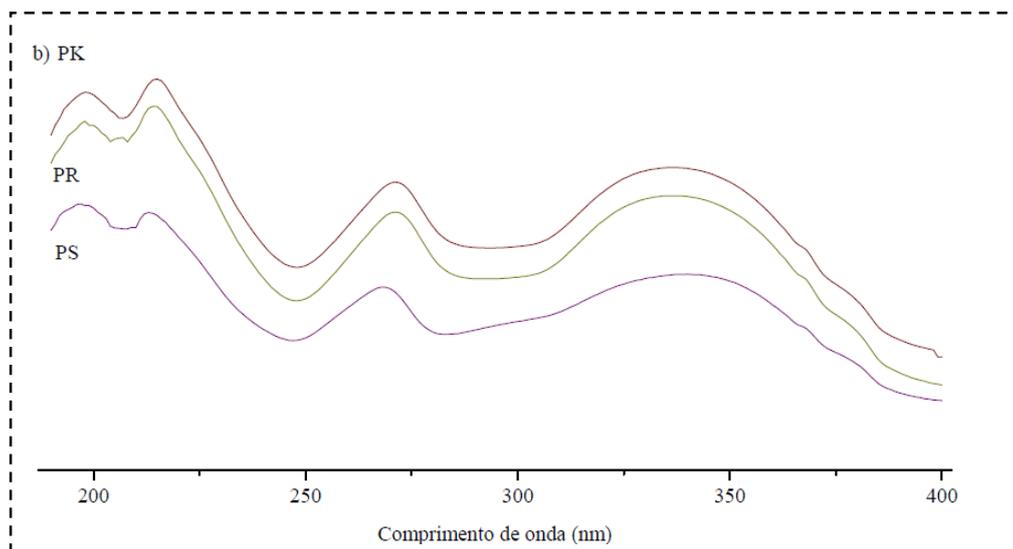
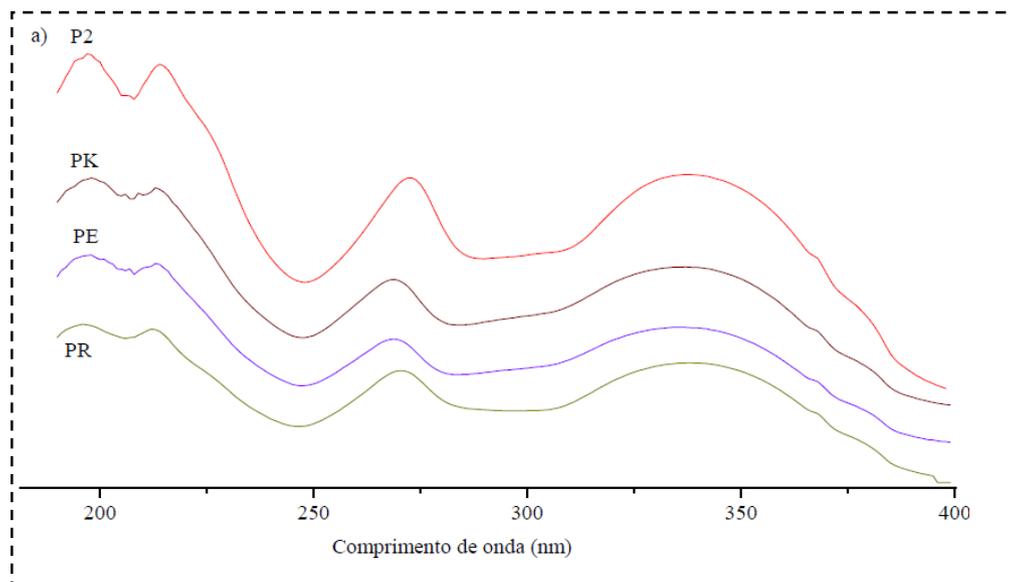


Figura 12 – Espectro dos padrões de flavonoides em a) isovitexina, b) vitexina, c) isoorientina e d) orientina.

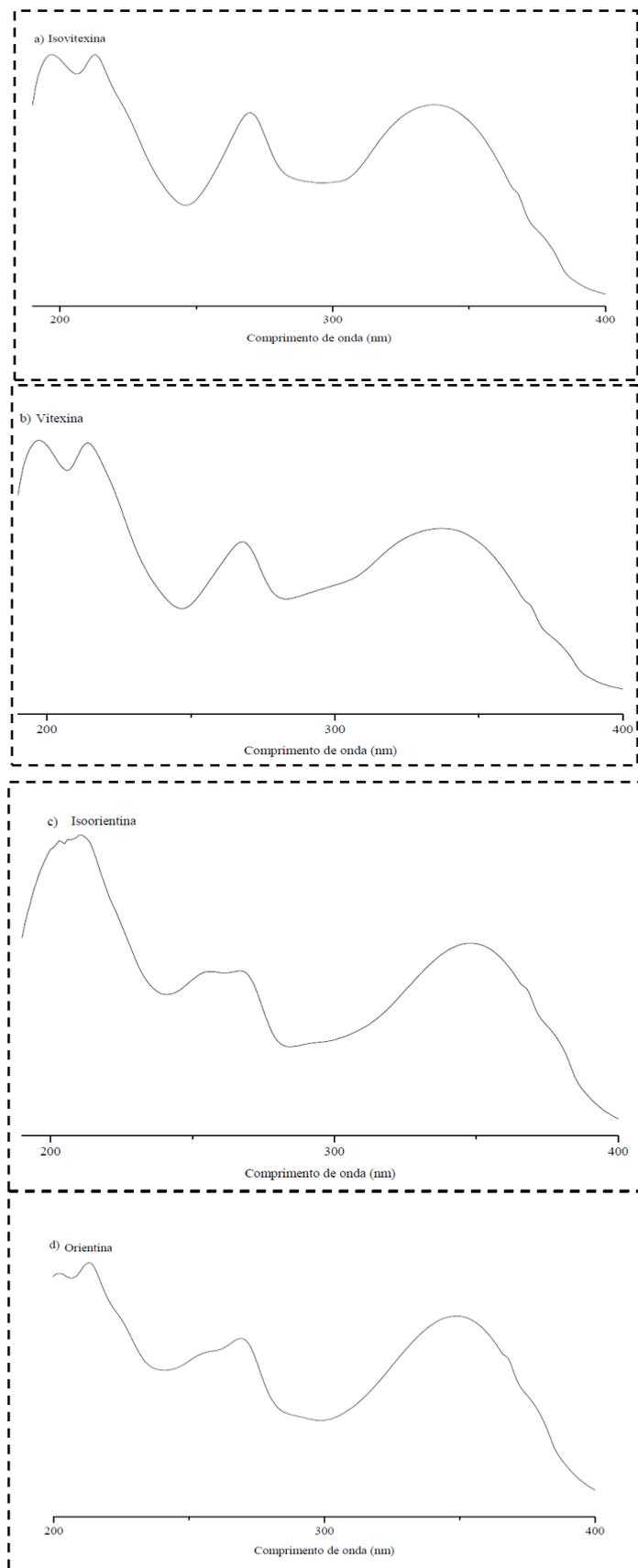


Tabela 4- Tempos de retenção (Tr) e comprimento de onda máximo (λ) característicos dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina.

Flavonoide	Tr (min)	λ (max)
Orientina	9,16	209, 272 e 345
Isoorientina	10,87	211, 263 e 351
Vitexina	12,44	208, 271 e 336
Isovitexina	16,95	210, 268 e 342

Tabela 5- Medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* analisados e os respectivos flavonoides identificados com os seus tempos de retenção (Tr) e comprimentos de onda (λ) absorvidos.

Medicamento	Tr (min)	λ (max)	Flavonoide
P1	-	-	-
P2	11,35	210,269 e 349	Isoorientina
	14,94	213,271 e 339	Isovitexina
P3	-	-	-
P4	-	-	-
P5	-	-	-

Tabela 5 – completa.

Amostra	Tr	λ	Flavonoide
	(min)	(max)	
P6	-	-	-
PO	-	-	-
PE	15,27	210,269 e 349	Isovitexina
*PS	13,93	212,267 e 213	Vitexina
PK	11,67	209,268 e 351	Vitexina
	15,59	213,270 e 338	Isovitexina
PR	11,44	209,270 e 348	Vitexina
	15,37	214,271 e 339	Isovitexina

* Apesar de ter espectro de vitexina, devida a diferença no T_r , deve ser um derivado.

Assim, os flavonoides comumente encontrados *Passiflora* vitexina, isovitexina e isoorientina foram identificados nas análises de HPLC dos medicamentos.

Os flavonoides vitexina e a isovitexina apresentaram espectros de ultravioleta parecidos, o que não permitiu a sua identificação somente pelo espectro, pois eles possuem a mesma estrutura básica do flavonoide que é responsável pelo comprimento de onda máximo de absorção (ZIELINSKA-PISKLAK, 2014). Estes compostos podem se diferenciar pela posição ou natureza do açúcar, ligado ao anel do flavonoide e o açúcar não tem efeito significativo no espectro de absorção de muitos flavonoides (VILLIERS et al., 2016).

Assim, com o HPLC foi possível separar os flavonoides presentes nos medicamentos fitoterápicos. Porém, a quantificação dos flavonoides detectados foi realizada com a RMN porque foi uma análise mais rápida de ser realizada, sem a necessidade de fazer umas curvas de calibração como era necessário para fazer as quantificações com HPLC e será descrita a seguir (2.4.2).

2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-¹H)

Como discutido na seção 2.4.1 a cromatografia permitiu uma análise qualitativa inicial dos medicamentos fitoterápicos e foi possível identificar a presença de três flavonoides nas amostras vitexina, isovitexina e isoorientina, porém se não houvesse a presença dos padrões de flavonoides não seria possível identifica-los nos respectivos medicamentos fitoterápicos. Assim, como uma ferramenta complementar a RMN foi também escolhida para fazer análises, pois é uma das principais técnicas usadas em metabolômica, além de fornecer uma análise mais completa, pois permite a elucidação total do esqueleto de uma molécula (SCHRIPSEMA, 2009 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Assim, foram obtidos onze espectros em metanol-d₄ (pois ele é geralmente usado para extratos polares (SCHRIPSEMA et al., 2009), conforme podemos ver na figura 13. Uma vez que os extratos dos medicamentos nas análises de HPLC foram obtidos em metanol, para uma comparação da impressão digital com o obtido em RMN o solvente usado deveria ser o mesmo, pois a mudança do solvente proporciona a mudança dos compostos extraídos de forma qualitativa e quantitativa (SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

Nos espectros dos onze medicamentos analisados foi possível identificar os sinais de dois flavonoides, especificamente os isômeros vitexina e isovitexina (SIMMLERC et al., 2014) e nas amostras dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* P2, PE, PS, PK e PR (figura 14). Isovitexina mostrou deslocamentos químicos 7,94 ppm (d, H-2 'e H-6'), 6,98 ppm (d, H-3 'e H-5'), 6,60 ppm (s, H-3) e 6,68 ppm (s, H-8) e vitexina mostrou deslocamentos químicos 6,5 ppm (s, H-6), 6,68 ppm (s, H-3), 6,90 ppm (d, H-3' e H-5') e 8,00 ppm (d, H-2' e H-6') conforme a tabela 6 e a figura 14.

Vitexina e isovitexina e seus derivados foram os compostos fenólicos mais comuns estudados nas espécies de *Passiflora*, seguido pelos compostos isoorientina e orientina e seus derivados (GADIOLI et al., 2018). Na tabela 6 se encontram os respectivos deslocamentos químicos e as atribuições para as amostras dos medicamentos analisados.

Figura 13 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* em CD_3OD e em a) região de 6,5-8,5 ppm ampliada (continua).

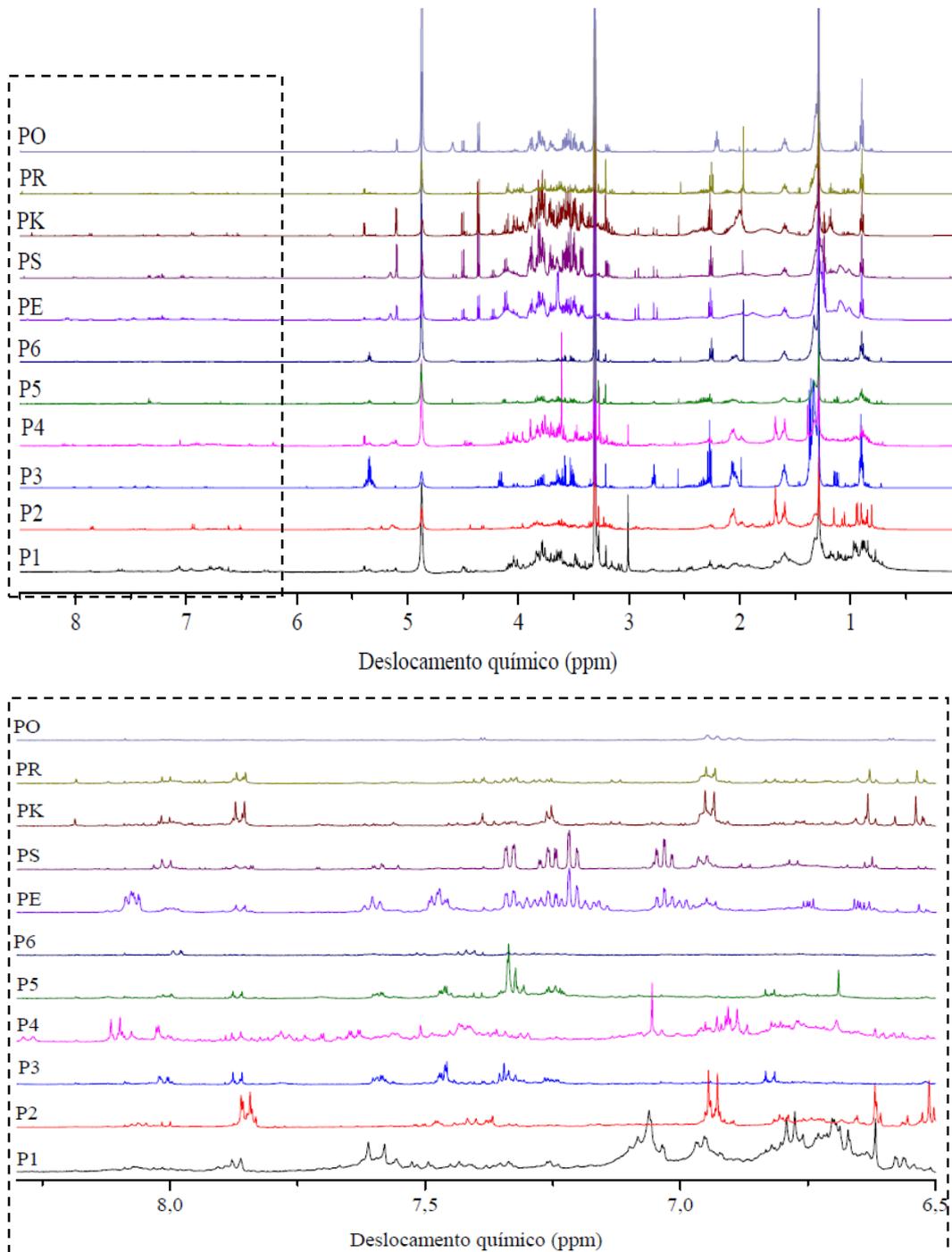
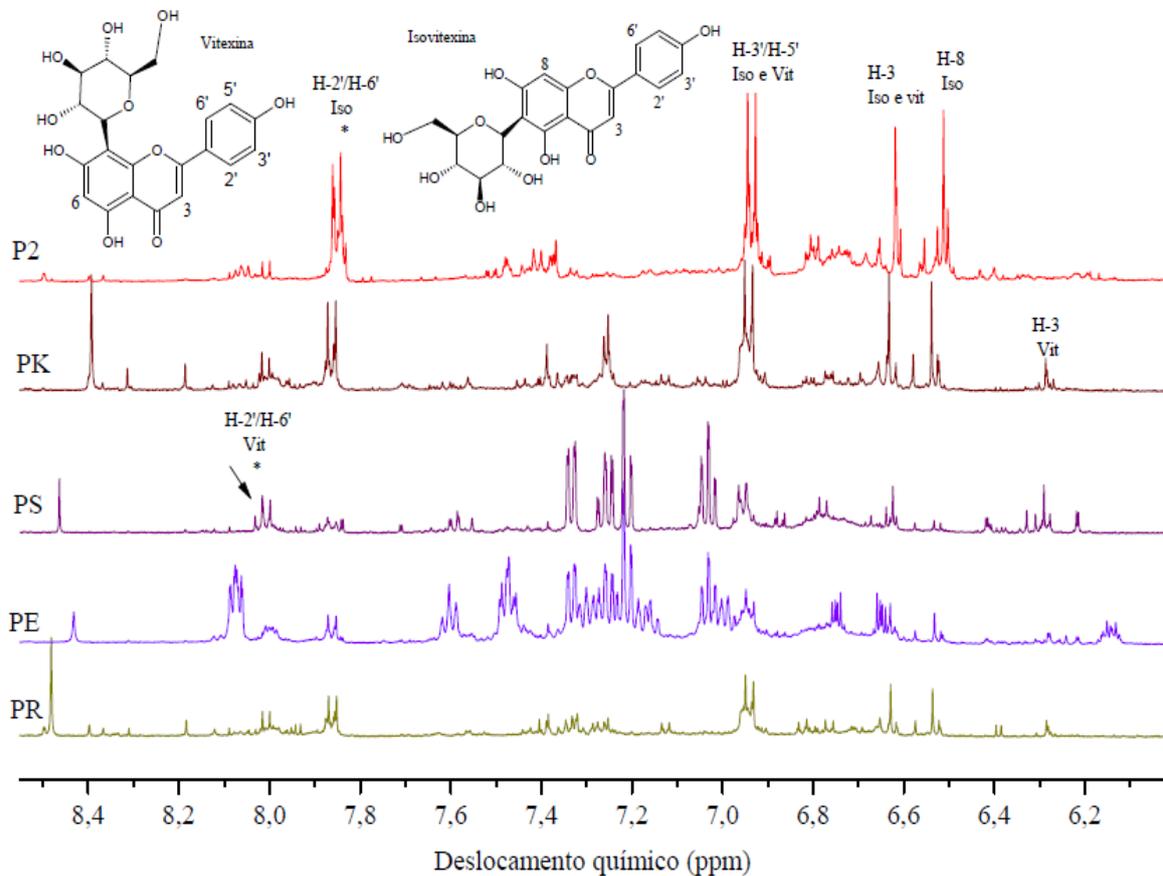


Figura 14 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* em CD₃OD com os respectivos sinais identificados da isovitexina e da vitexina.



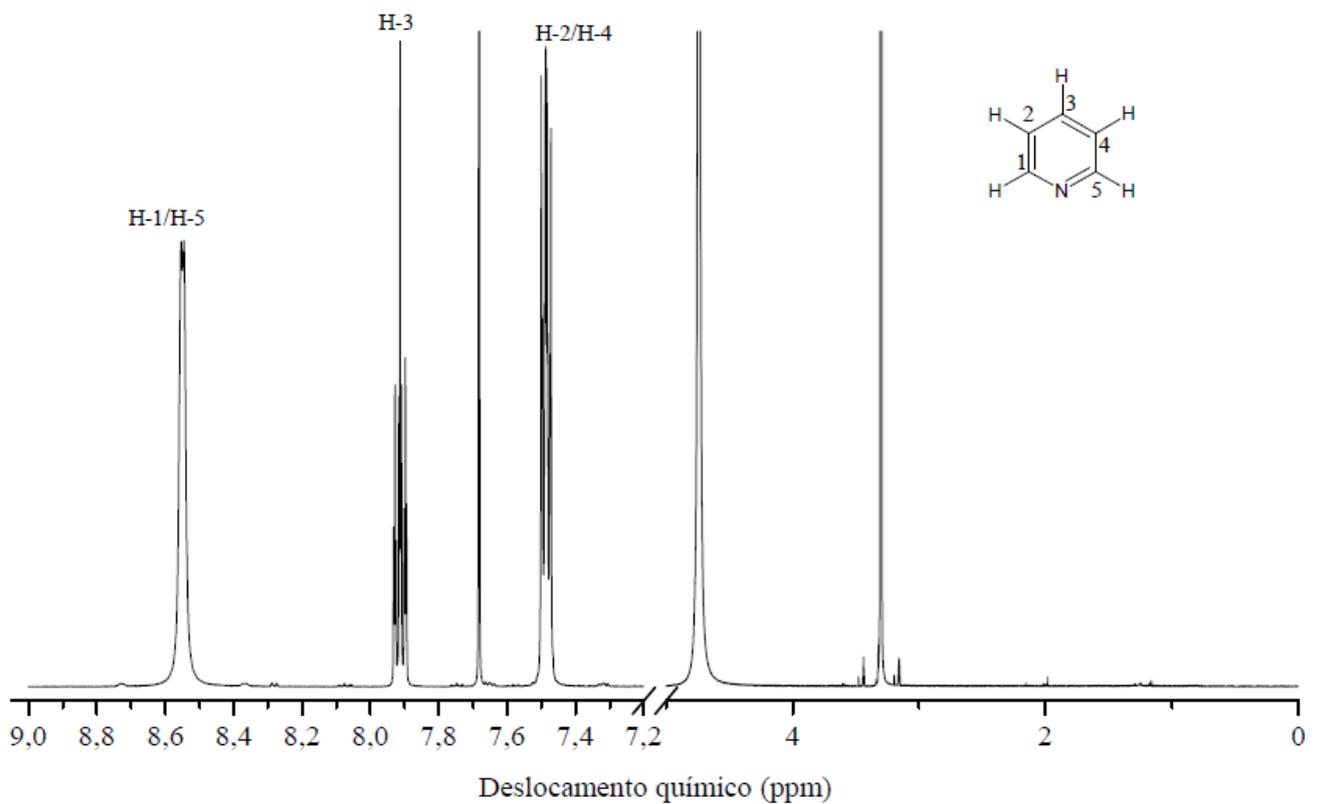
Logo, de acordo com os espectros (figura 13 e 14 das amostras P2 e PE só observamos a presença da isovitexina, na amostra PS só foi observada a presença da vitexina e nas amostras PK e PR foram observados isovitexina e vitexina. A presença da vitexina e isovitexina nestes dois medicamentos pode indicar a presença da espécie *P. incarnata* SANTOS et al., 2017 e WOSCH et al., 2017) e nos demais medicamentos não haviam flavonoides.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos para os espectros de RMN-¹H para os medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* em comparação com aqueles relatados na literatura (FARAG et al., 2016) em metanol deuterado.

Flavonoide	¹ δ H	Multipl- cidade	Atribuição	¹ δ H										
	(P1)			(P2)	(P3)	(P4)	(P5)	(P6)	(PO)	(PE)	(PS)	(PK)	(PR)	
Vitexina	8,00	d	H-2'/H-6'	-	-	-	-	-	-	-	-	8,03	8,03	8,03
Vitexina	6,90	d	H-3'/H-5'	-	-	-	-	-	-	-	-	6,98	6,96	6,96
Vitexina	6,68	s	H-3	-	-	-	-	-	-	-	-	6,64	-	-
Vitexina	6,51	s	H-6	-	-	-	-	-	-	-	-	6,31	6,30	6,31
Isovitexina	7,94	d	H-2'/H-6'	-	7,87	-	-	-	-	-	7,89	-	7,89	7,88
Isovitexina	6,94	d	H-3'/H-5'	-	6,96	-	-	-	-	-	6,97	-	6,96	6,96
Isovitexina	6,62	s	H-3	-	6,64	-	-	-	-	-	6,64	-	6,65	6,64
Isovitexina	6,52	s	H-8	-	6,53	-	-	-	-	-	6,54	-	6,55	6,55

As quantidades dos flavonoides vitexina e isovitexina encontrados nas amostras de medicamentos de *Passiflora* encontram-se nas tabelas 7 e 8 respectivamente. O espectro da piridina foi medido para os cálculos de quantificação que se encontram na figura 15.

Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) da piridina em CD_3OD .



Na tabela 7 encontram-se as quantidades de vitexina detectadas por comprimido nas amostras PS, PK e PR.

Tabela 7 - Quantidade detectada de vitexina por RMN-¹H para os medicamentos contendo *Passiflora* analisados.

Medicamentos	PS	PK	PR
Massa do solvente (mg)	727	731	727
Integral (pir) $\delta = 8,6$	$2,47 \times 10^3$	$8,7 \times 10^{-2}$	$8,7 \times 10^{-2}$
Integral (vit) $\delta = 7,9$	$4,20 \times 10^3$	$3,2 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-2}$
Razão (vit/pir)	1,7	0,4	0,6
Quantidade (vit) μmol	2,26	4,25	7,15
Massa de (vit) mg	0,9	0,02	$3,85 \times 10^{-6}$
Massa do comprimido de Vit (mg)	547	358	416
Massa do comprimido pesado	101	106	102
Massa de Vit por comprimido (mg)	5,18	0,06	0,12

Tabela 8 - Quantidade detectada de isovitexina por RMN-¹H para os medicamentos contendo *Passiflora* analisados.

Medicamentos	P2	PE	PK	PR
Massa do solvente (mg)	725	730	731	727
Integral (pir) $\delta = 8,6$	0,087	0,087	0,087	0,087
Integral (iso) $\delta = 7,9$	0,05	0,003	0,005	0,001
Razão (Iso/pir)	0,62	0,03	0,05	0,01
Quantidade (Iso) μmol	0,82	0,04	0,07	0,02
Massa de (Iso) mg	0,36	0,02	0,03	0,007
Massa do comprimido de Iso (mg)	280	341	360	416
Massa do comprimido pesado	104	104	106	102
Massa de Iso por comprimido (mg)	0,9	0,05	0,1	0,03

De acordo com os cálculos das tabelas 7 e 8 verificamos que houve uma variação da quantidade de isovitexina entre as amostras e a amostra P2 foi a que teve a maior quantidade deste composto, enquanto que para vitexina a amostra PK foi a que apresentou a maior quantidade. Assim, não observamos a presença de vitexina e isovitexina juntas em todos os medicamentos analisados, somente em dois medicamentos (PK e PR). De acordo com os cálculos a quantidade de vitexina e de isovitexina também não foi à mesma quando elas estão presentes nas amostras de medicamentos fitoterápicos.

2.4.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

No gráfico de PCA, referente aos espectros de RMN-¹H dos medicamentos analisados (figura 16) observamos que elas demonstram dois agrupamentos distintos (PS, PK, PE, PR e PO) e (P1, P2, P3, P4, P5 e P6). Isso pode ser explicado pela sua origem as amostras dos medicamentos fitoterápicos PS, PK, PE, PR e PO foram adquiridos em farmácias, enquanto que as amostras dos medicamentos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 foram adquiridos em mercados municipais. Com os medicamentos adquiridos em farmácias a sua composição é conhecida, pois sabemos as plantas que foram usadas para a sua confecção, PR e PK possuem a mesma planta, assim como PS e PE. A amostra do medicamento PO também tem a composição conhecida, mas, é diferente das demais do seu grupo o que justifica a sua posição no plote de PCA. Para os outros medicamentos não sabemos a composição, pois não havia a sua descrição no rótulo, mas de acordo com o PCA eles tem composição química semelhante. Assim, através da análise de PCA foi possível observar o agrupamento das dos medicamentos em dois grupos de acordo com os seus perfis químicos (GOODARZI et al., 2013 e ALAN et al., 2015; SCHRIPSEMA et al., 2009 SCHRIPSEMA et al., 2014 e SCHRIPSEMA et al., 2015).

De acordo com o score plot (fig. 17) verificamos que o pico de RMN com deslocamento químico em 1,28 ppm contribui para a separação da amostra PO, enquanto que os picos de RMN com deslocamento químico de 1,32 e 1,36 ppm

contribuíram para a separação das amostras P3 e P6. Esses picos são bem intensos nos espectros e por isso contribuem fortemente para a separação desses medicamentos. Esses picos correspondem a compostos da região alifática (BRUICE, 2006).

Figura 16 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos metanólicos analisados por RMN-¹H dos onze medicamentos contendo *Passiflora* na região de 1-10 ppm.

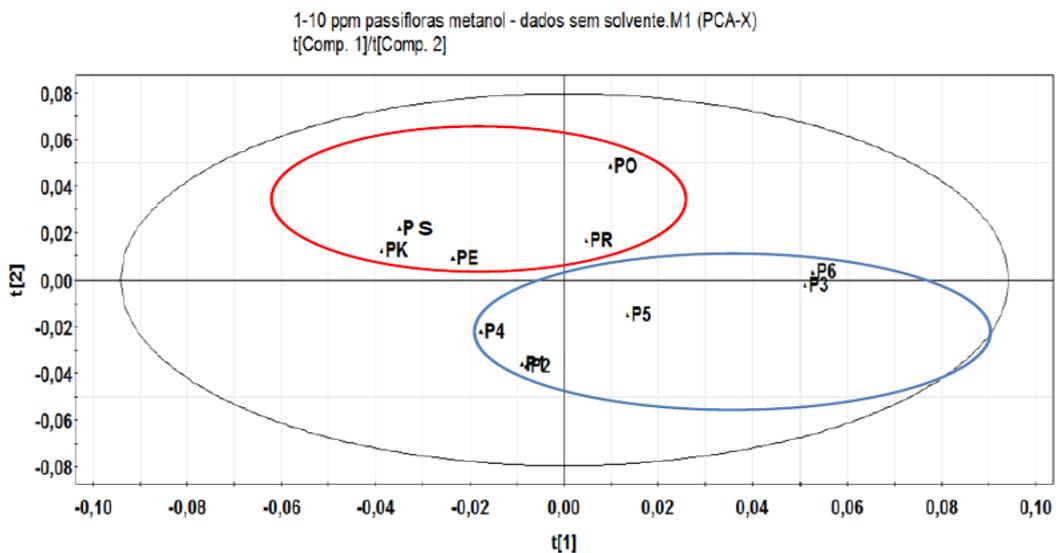
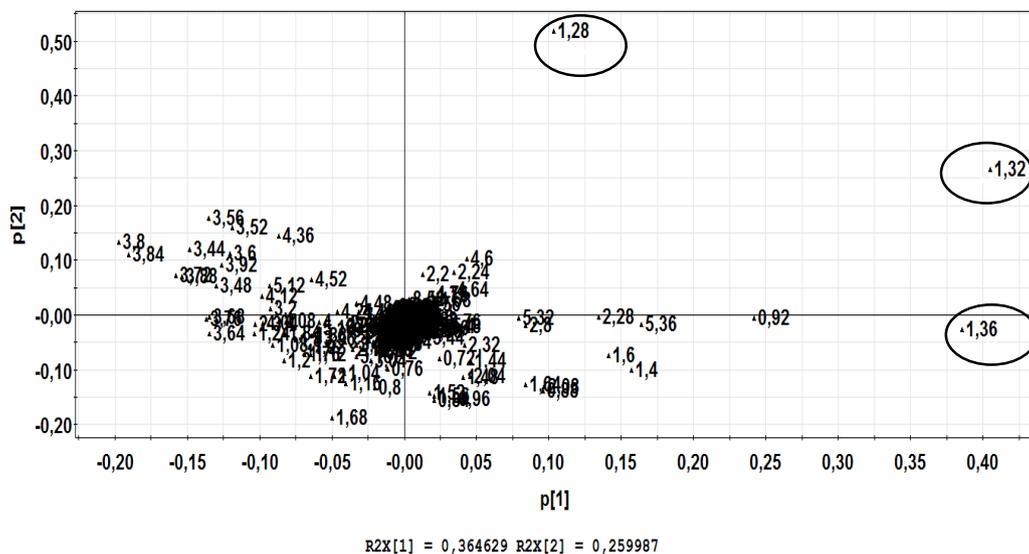


Figura 17 - Score Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos metanólicos analisados por RMN-¹H dos onze medicamentos contendo de *Passiflora* da região de 1,0 – 10,0 ppm.



Deste modo, não podemos distinguir as amostras de medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* usando PCA, pois a separação das mesmas no PCA é determinada por picos majoritários e despreza os picos minoritários que podem ser usados para explicar o agrupamento das amostras. Logo, esta técnica serve então para visualizar os dados de modo global (GOODARZI et al., 2015).

2.4.4 CÁLCULOS DE SIMILARIDADE

De acordo com os cálculos de similaridade das amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* (tabela 9) podemos comparar cada amostra com ela mesma e com as demais e verificar a sua similaridade. Os cálculos de similaridade foram realizados pelo método do *floating bins* porque os dados foram mais refinados, pois com esses cálculos há a correções de erros de calibração no espectro, tais como, alinhamento, fase e variações no deslocamento químico que contribuem para a avaliação da similaridade das amostras conforme discutido por Schripsema.,2019.

Tabela 9– Tabela de similaridade dos medicamentos contendo *Passiflora* a partir do método de *floating bins*.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	PO	PE	PS	PK	PR
P1	100	75,5084	52,2113	78,049	73,036	51,8339	42,8423	67,7846	63,4533	58,5008	64,749
P2	75,5084	100	58,6992	79,5915	72,7669	52,5714	40,4312	64,087	60,1926	62,0674	63,2254
P3	52,2113	58,6992	100	57,0417	69,1728	70,8357	46,5429	56,7195	52,8891	50,7174	66,5805
P4	78,049	79,5915	57,0417	100	76,4465	54,511	44,761	69,6851	67,6183	70,8008	70,9435
P5	73,036	72,7669	69,1728	76,4465	100	69,1291	51,1906	65,9869	62,0672	62,1706	73,977
P6	51,8339	52,5714	70,8357	54,511	69,1291	100	63,6195	50,5118	46,1705	42,2798	64,239
PS	42,8423	40,4312	46,5429	44,761	51,1906	63,6195	100	51,4927	48,0856	42,4503	56,1
PE	67,7846	64,087	56,7195	69,6851	65,9869	50,5118	51,4927	100	84,441	69,5736	70,5751
PS	63,4533	60,1926	52,8891	67,6183	62,0672	46,1705	48,0856	84,441	100	78,8758	66,4953
PK	58,5008	62,0674	50,7174	70,8008	62,1706	42,2798	42,4503	69,5736	78,8758	100	68,2987
PR	64,749	63,2254	66,5805	70,9435	73,977	64,239	56,1	70,5751	66,4953	68,2987	100

Se compararmos o agrupamento das amostras dos medicamentos no plote de PCA com os dados da tabela 9 de similaridade pelo método de *floating bins* verificamos que a similaridade entre as amostras dos medicamentos fitoterápicos PR, PK, PS e PE varia de 65 a 68 % e que a amostra do medicamento fitoterápicos PO mostrou maior dissimilaridade entre os

medicamentos deste grupo. Verificamos também que há uma similaridade entre as amostras dos medicamentos P1, P2, P4 e P5 ao redor de 70 a 80 % e que as amostras dos medicamentos P3 e P6 mostraram-se bem diferentes destas amostras de medicamentos desse grupo.

Através dos cálculos de similaridade foi possível confirmar o agrupamento das amostras no PCA e fornecer uma comparação quantitativa das mesmas (GOODARZI et al.,2013). Assim, concluímos que os agrupamentos das amostras dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* nas análises de PCA estavam de acordo com os cálculos de similaridade e que estes cálculos permitiram mensurar o quão similar os medicamentos eram.

2.4.5 ESPECTROS DIFERENCIAIS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HDROGÊNIO (RMN-¹H)

Através da espectroscopia diferencial foi possível apontar as diferenças nos espectros de -RMN-¹H de algumas amostras de medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* e também entender as suas semelhanças apontadas por estes medicamentos no PCA e nos cálculos de similaridade.

Assim foram analisados os espectros diferenciais dos medicamentos contendo *Passiflora* P1 e P4 (fig.18) P2 e P4 (fig. 19), P3 e P6 (fig.20), P5 e P6 (fig. 21), todas de composição desconhecida a fim de observamos os picos de compostos que fossem comuns a esses medicamentos e que pudessem justificar os valores de similaridade para eles encontrados. Observamos ao longo dos espectros poucos picos em comum que estão identificados na tabela 10.O mesmo acontece para os medicamentos PO e P6 (fig. 22) e P5 e PR (fig. 23). De acordo com a referida tabela observamos que os picos encontrados nos espectros diferenciais são picos na região de açúcares e compostos alifáticos (BRUICE, 2006) e eles são os mais intensos nos medicamentos e contribuindo significativamente para os valores de similaridade calculados.

Figura 18 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos P1 e P4, em a) a ampliação da região aromática (6,5-8,0 ppm).

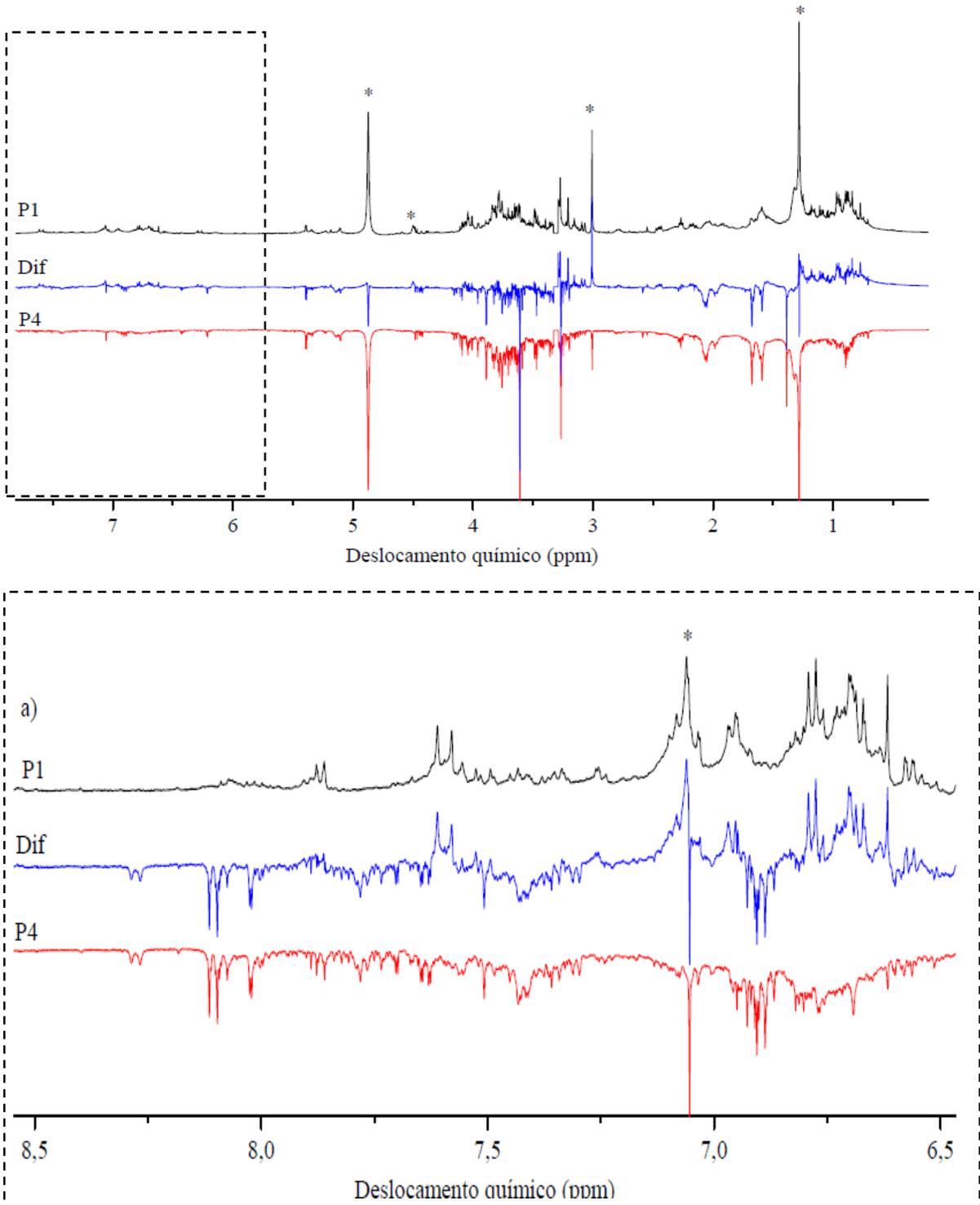


Figura 19 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos P2 e P4, em a) ampliação da região de 2,0-4,5 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.

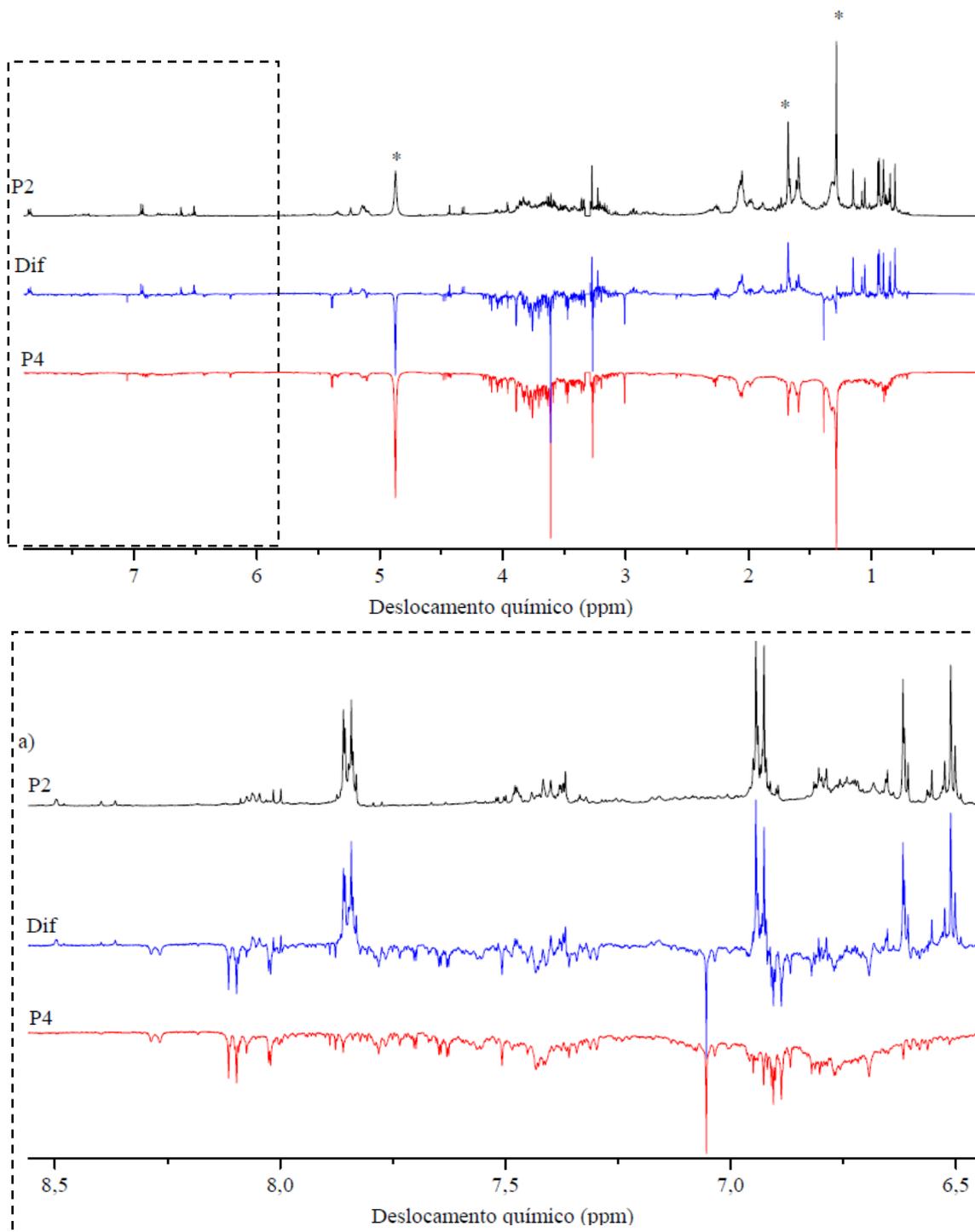


Figura 20 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos P3 e P6. Em a) ampliação da região de 2,0-4,5 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.

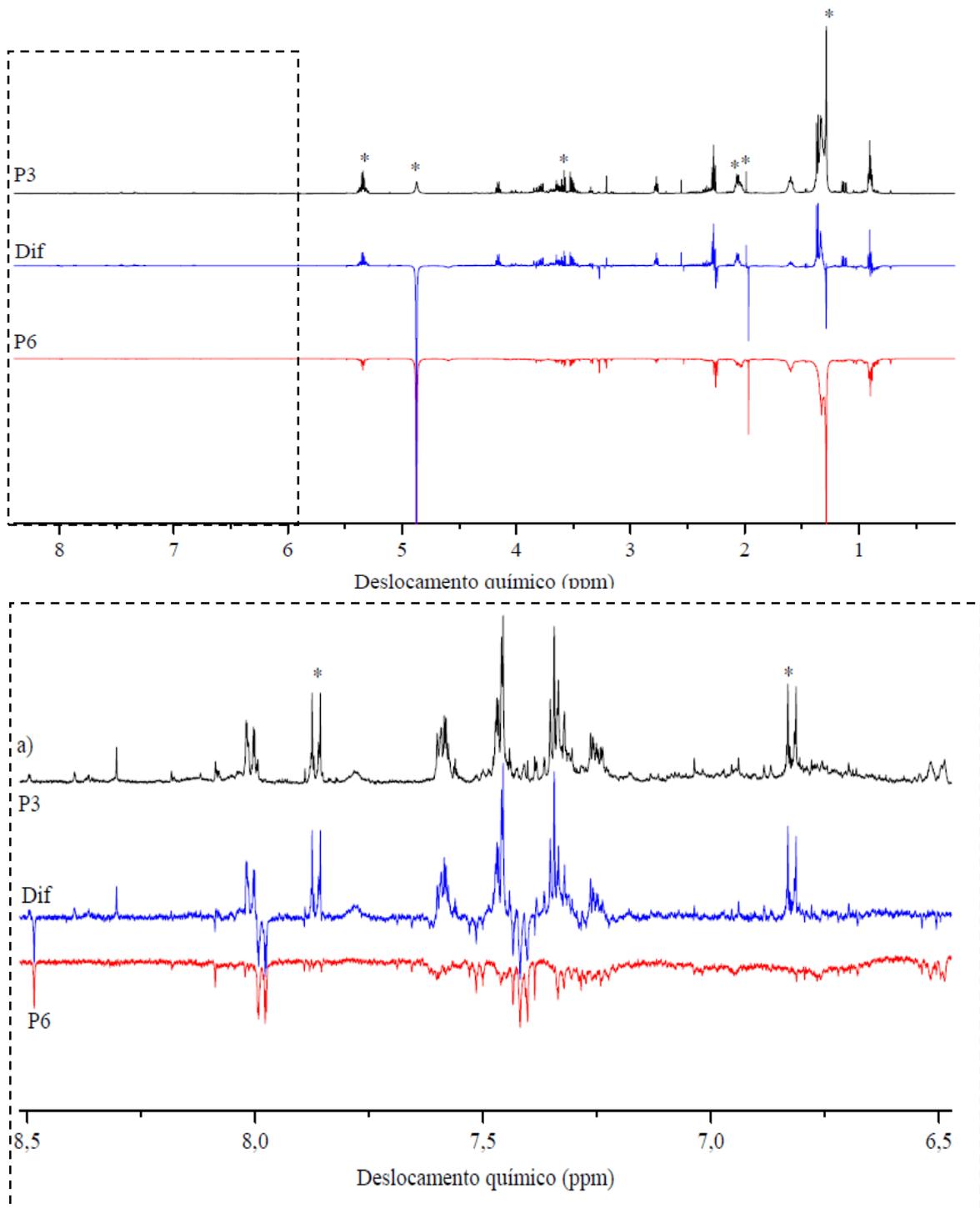


Figura 21 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos P5 e P6. Em a) ampliação da região de 1,0-5,0 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.

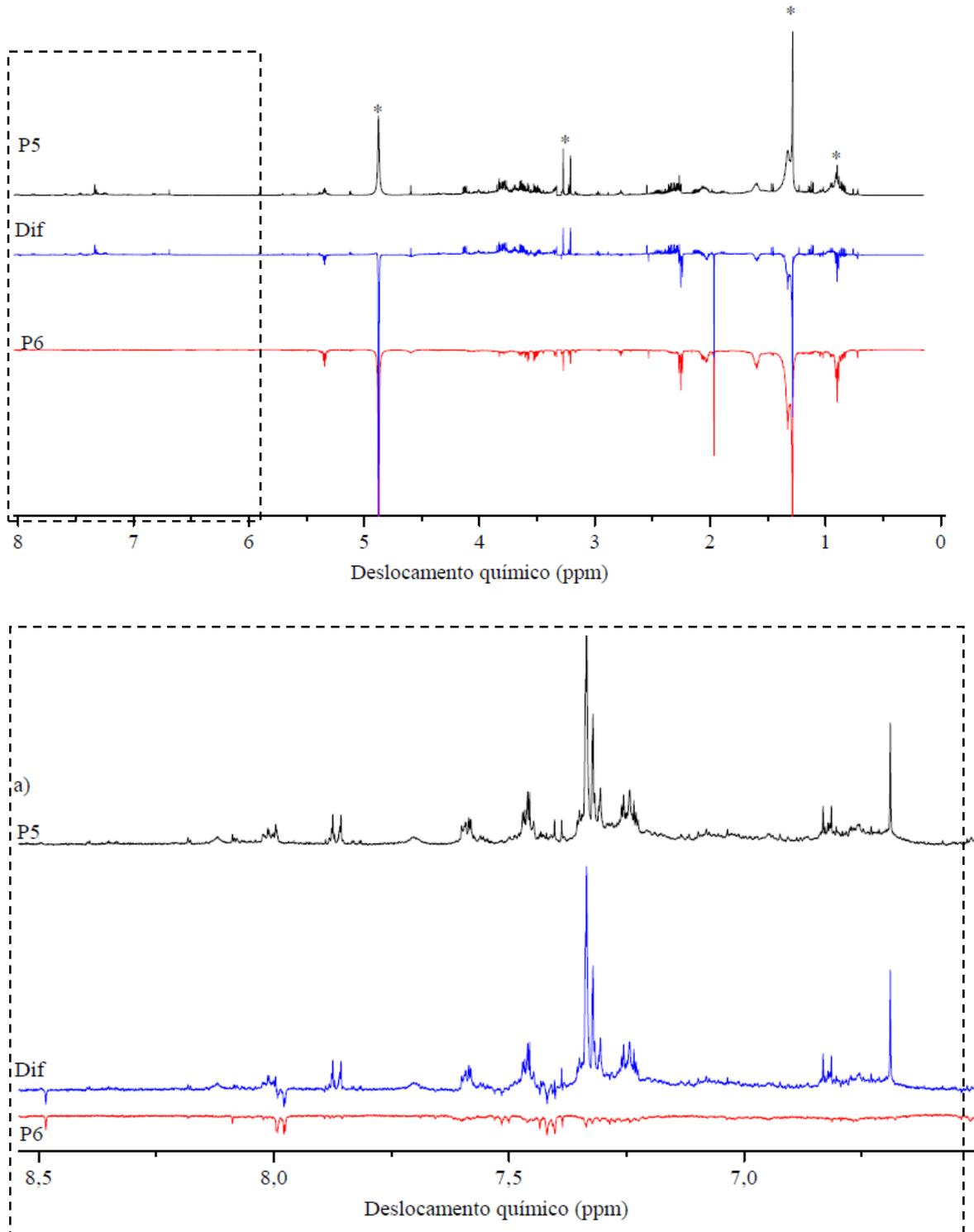


Figura 22 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos PO e P6. Em a) ampliação da região de 0,0-5,0 ppm e em b) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.

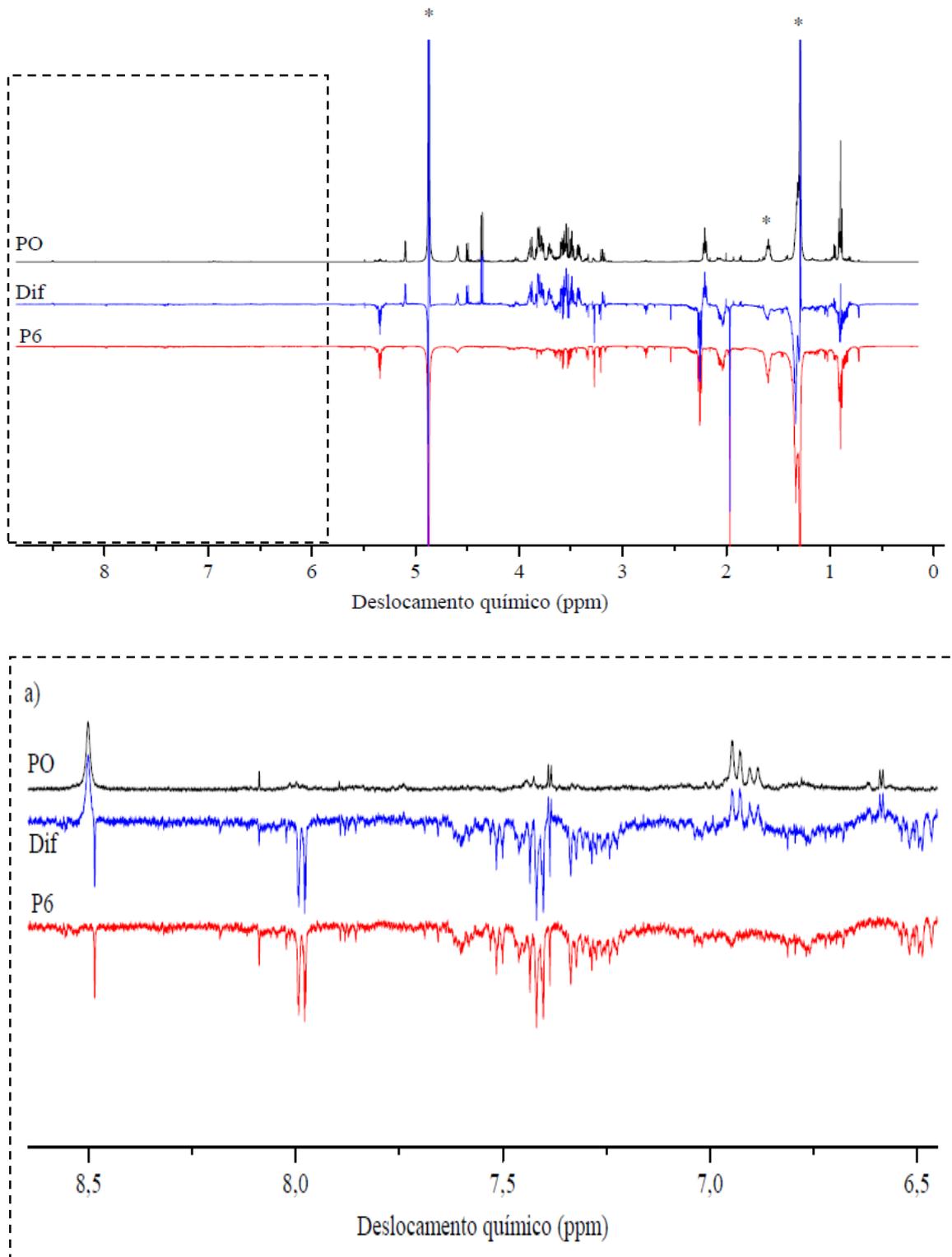
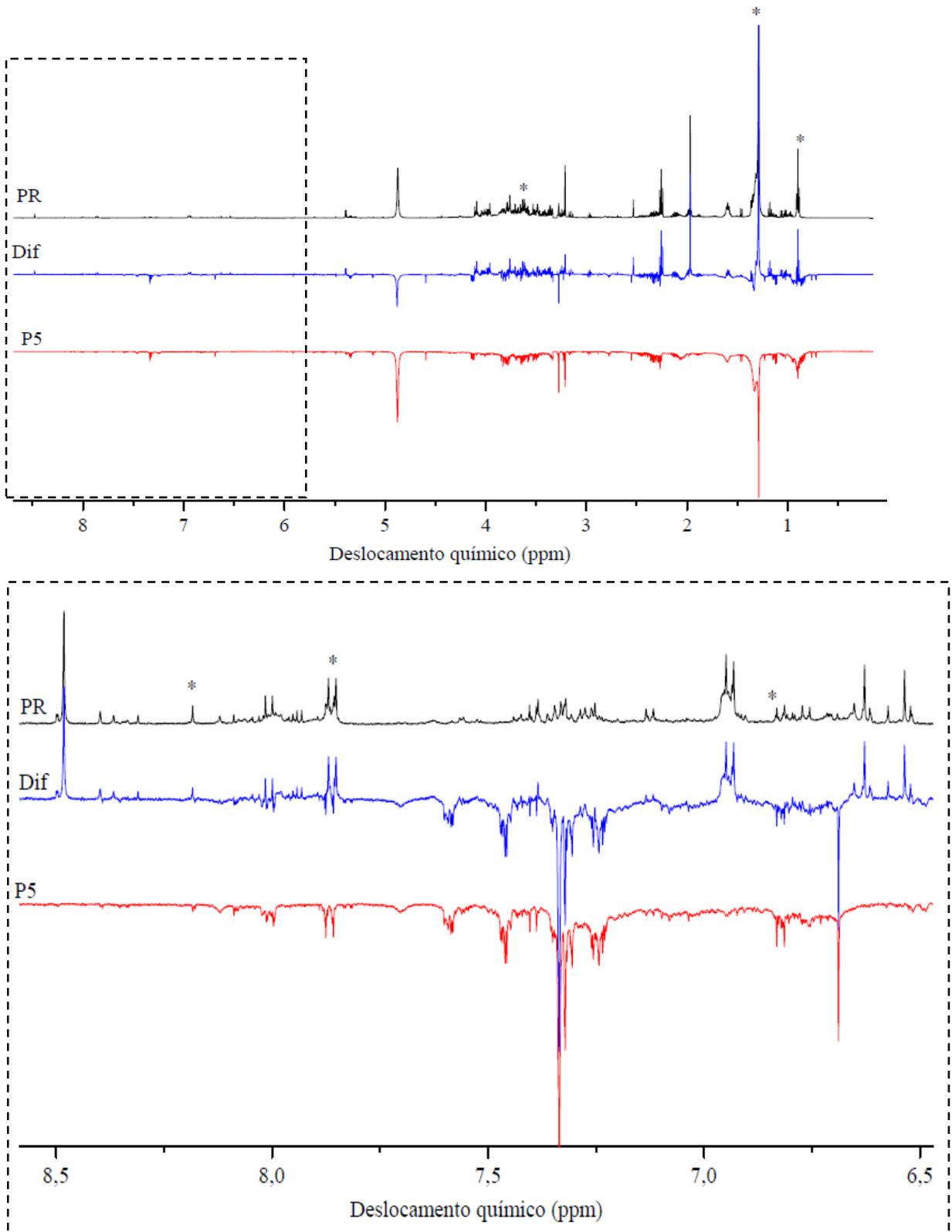
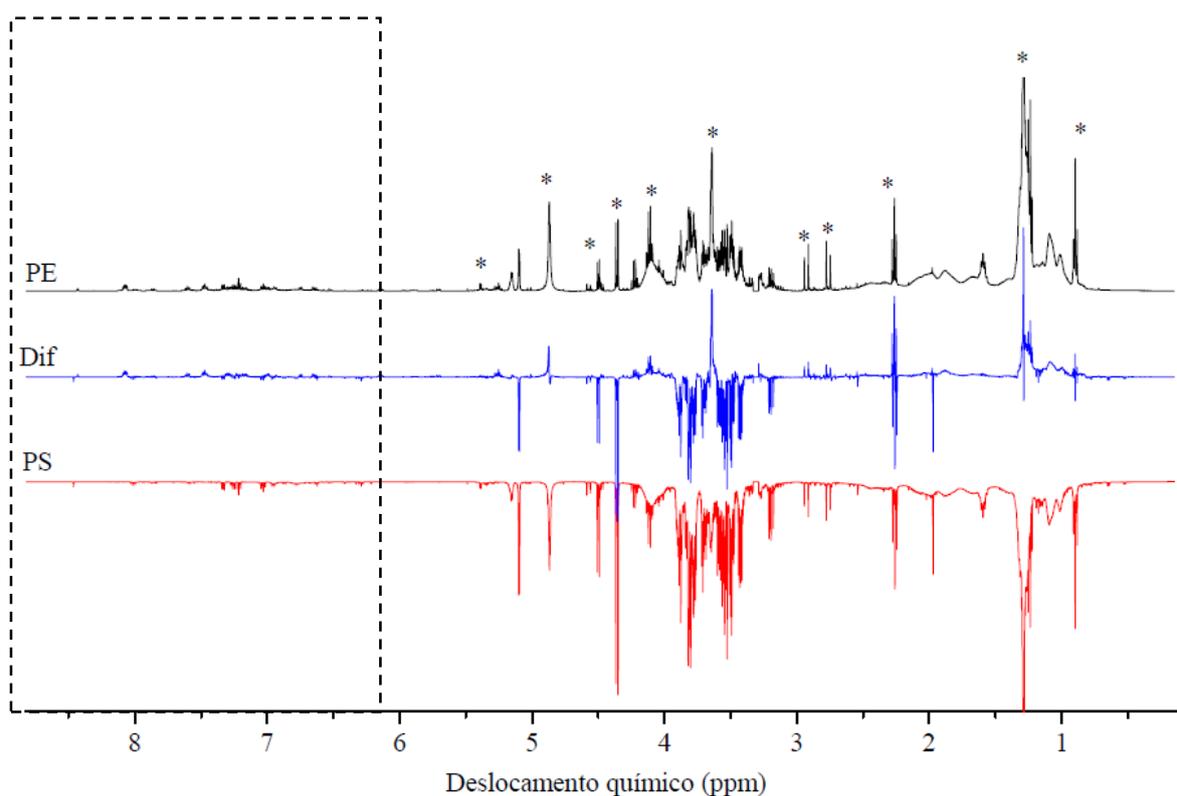


Figura 23– Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos P5 e PR. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.



Nos espectros diferenciais dos medicamentos PE e PS (fig.24) e PK e PS (fig. 25) foram observados mais picos (tabela 10) em comum ao longo dos seus espectros, logo para estes medicamentos há uma maior semelhança com relação a sua composição química, o que já foi observado no plote de PCA (fig. 16) e na tabela de similaridade (tab. 8). Esse número significativo de picos em comuns pode ser explicado porque PE e PS possuem a mesma composição, assim como PK e PS. Logo, poucas diferenças foram observadas em seus espectros.

Figura 24 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos PE e PS. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.



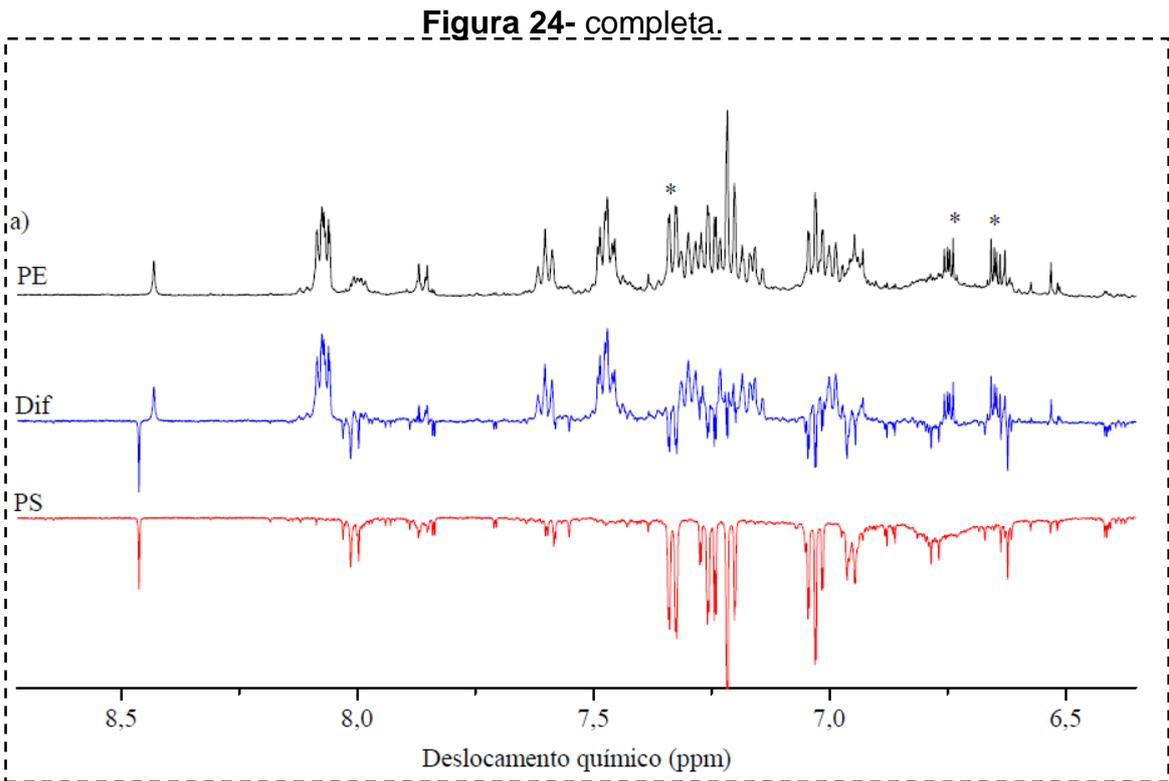


Figura 25 – Espectro diferencial de RMN-¹H dos medicamentos PK e PS. Em a) ampliação da região de 6,0-8,5 ppm.

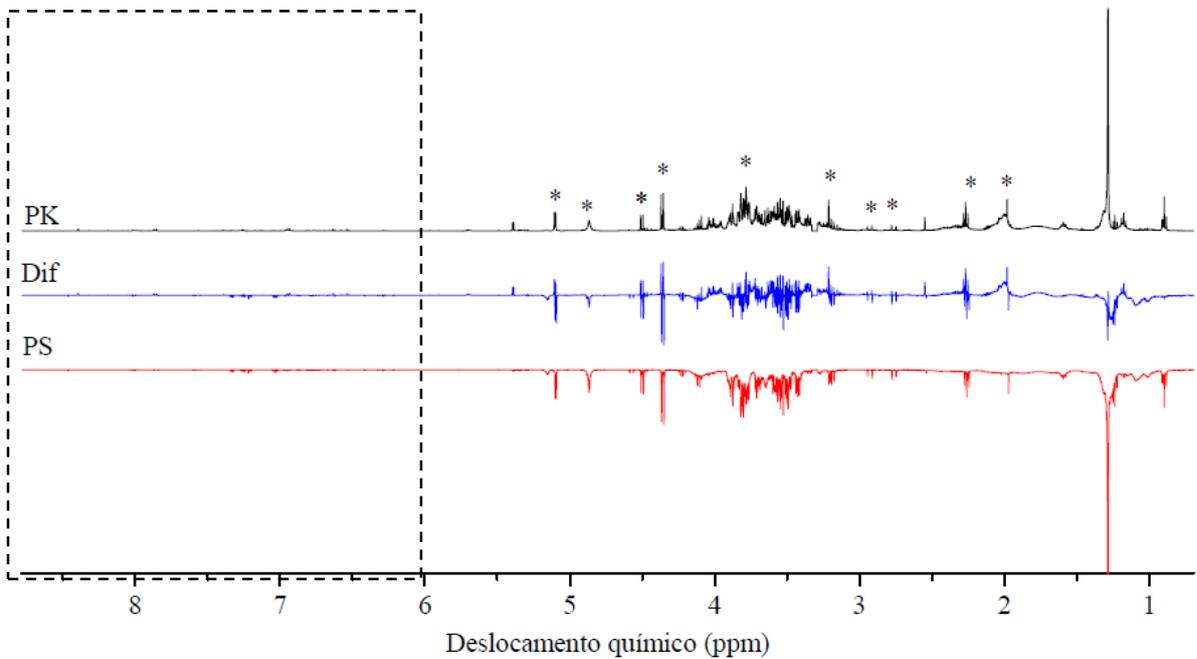


Figura 25- completa.

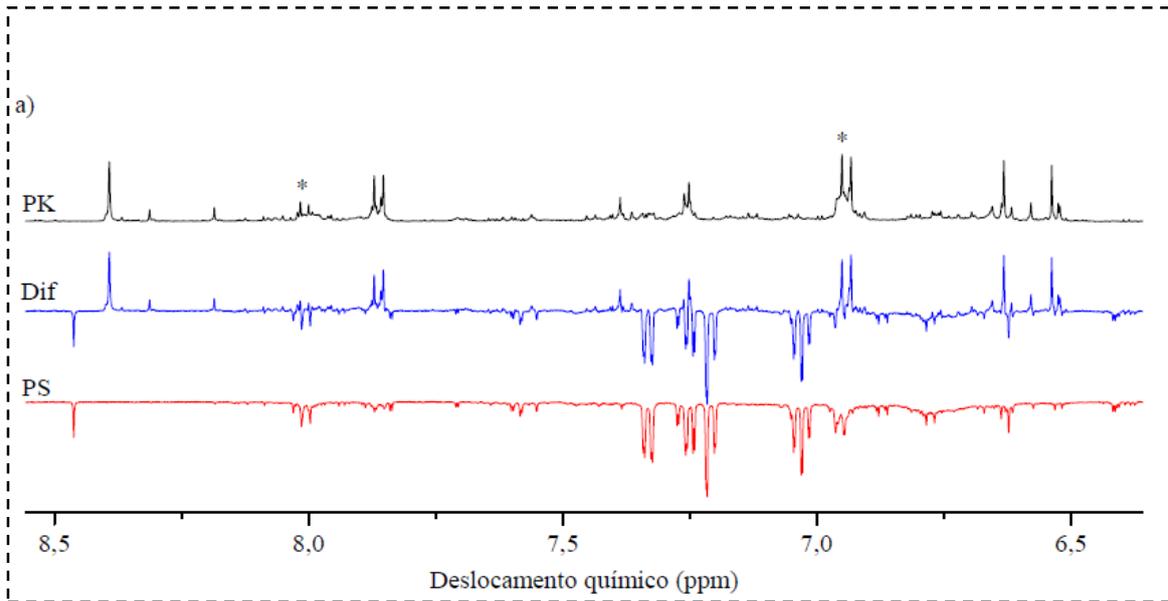


Tabela 10 – Picos em comum identificados nos espectros diferenciais dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora*.

Medicamentos	δ ^1H (ppm)
P1 e P4	1,28 / 3,01/ 4,87/ 5,10/ 5,39/ 6,29/ 7,85
P2 e P4	1,28/1,67/3,27
P3 e P6	1,28/2,55/3,50/ 4,80/ 6,80/ 7,45/ 7,87
P5 e P6	0,89/ 1,28/ 3,27/ 4,87/5,34
PO e P6	0,89/1,28/ 4,86
P5 e PR	0,89/ 1,28/ 3,50/ 4,86/ 6,38/ 7,85/ 8,00
PS e PE	0,89/ 1,069/ 2,6/2,47/2,91/3,53/4,10/4,55/4,86/ 6,60/7,23
PK e PS	0,89/ 1,23/2,26/2,70/2,74/3,21/3,80/4,35/4,87/5,09/6,90/8,00

De acordo com os espectros de diferenças das amostras dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* conseguimos verificar que os medicamentos de composição desconhecida são bem distintos com relação à composição dos seus constituintes.

2.5 CONCLUSÕES

De acordo com as análises de HPLC confirmamos a presença da classe de compostos denominada flavonoides em alguns medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* e através da RMN-¹H detectamos quantidades diferentes dos flavonoides vitexina e isovitexina em cinco dos onze medicamentos fitoterápicos analisados, assim verificamos que não há uma padronização na quantidade destes compostos em tais medicamentos. A investigação da composição química global dos medicamentos foi realizada pela análise de PCA e por cálculos de similaridade que dividiram os medicamentos em dois grupos de composição química similar. Com os espectros de diferenças apontamos as diferenças entre cada par de medicamentos e concluímos que os medicamentos fitoterápicos apresentaram uma composição química diversificada e que não há uma padronização na confecção deles.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, T.A.; ALAM, .K.; *Chemometric Analysis of NMR Spectroscopy data: A Review, Annual reports on NMR spectroscopy*, vol.54, p.41-80,2005.
- BRUICE, P.Y. *Química orgânica*. V.2, 4 ed. São Paulo: Pearson, 2006.
- CAZARIN, C.B.B.; SILVA, J.K.; COLOMEU, T.C.; ZOLLNER, R.L.; JUNIOR, M.R.M.; Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora Edulis*), *Ciência Rural*, v.44, p.1699-1704, 2014.
- CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H.; *Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de Maytenus (Celastraceae) e de Passiflora (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2009, 19:860-864.

- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C.; *Cromatografia um breve ensaio, Química Nova na Escola*, v.7, p.21-25, 1998.
- FAN, X.H.; CHENG, Y.Y.; YE, Z.L.; LIN, R.C.; QIAN, Z.Z.; *Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicine, Analytica Chimica Acta*, 2006, 555: 217-224.
- FARAG, M.A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C.G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L.A.; *Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus Passiflora Leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools, Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 3125-3143.
- GADIOLI, I.L.; CUNHA, M.S.B.; CARVALHO, M.V.O.; COSTA, A.M.; PINELI, L.L.O.; *A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine, Critical reviews in food science and nutrition*, Vol.58, N° 5, p.785-807.
- GOODARZI, M.; RUSSELL, P.J.; HEYDEN, Y.V.; *Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review, Analytica Chimica Acta*, vol.804, p.16-28, 2013.
- HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B.; *Quantitative NMR spectroscopy – Applications in drug analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38: 806-812.
- HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B.; *Quantitative NMR spectroscopy – applications in drugs analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 2005, N° 38, 806-812.
- INGALE, A.G.; HIVRALE, A.U.; *Pharmacological studies of Passiflora sp. And their bioactive compounds, African Journal of Plant Science*, 2010, 4: 417-46
- JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARAES, L.F.L.; *Fundamentos da cromatografia*, editora Unicamp, capítulo IX, p. 273-397, 2006.
- KUMARI, R.; *A Review on the Standardization of herbal medicines, International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2016, 7: 97-106.
- LIANG, Y.Z.; XIE, P.; CHAN, K., *Quality Control of herbal medicine, Journal of Chromatography B*, 2004, 812: 53-70.
- MIRODDI, M; CALAPAI.; G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P.L.; GANGEMI, S.; *Passiflora incarnata L: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials, Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150: 791-804.

MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B.; *Quantification of the Flavonoid Glycosides in Passiflora incarnata by Capillary Electrophoresis*, **Planta Med**, 2003, 69: 452-456.

PASSONI, L.C.; Aula 6: Cromatografia líquida de alta eficiência, CEDERJ, Rio de Janeiro, p.1-27, 2014.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; McCULLAGH, M; *Distinction of the C-glycosy flavone isomer pairs orientin/isoorientina and vitexin/isovitexina using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID*, **Phytochemical Analysis**, 2005, 16: 295-301.

RÁCZ, A.; ANDRIC, F.; BAJUSZ, D.; HÉBERGER, K.; *Binary similarity measures for fingerprint analysis of qualitative metabolomics profiles*, **Metabolomics**, pp.1-9,2018.

REHWALD, A.; MEIER, B.;STICHER, O.; *Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Passiflora incarnata L.*; **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 1994, 69: 153-158.

SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A.; *Validação de Método Quantitativo Por RMN de ¹H Para Análises De Formulações Farmacêuticas*, *Quim. Nova*, 2013,36: 324-330.

SCHRIPSEMA, J.; *Application of RMN in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects*, **Phytochemical Analysis**, vo.21, pp.14-21, 2009.

SCHRIPSEMA, J.; *Similarity and differential RMN spectroscopy in metabolomics: application to the analysis of vegetable oils with ¹H and ¹³C RMN*, **Metabolomics**, pp. 1-12, 2019.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; *Metabolomics, Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*, First Edition, 2015.

SCHRIPSEMA, J.; LEMOS, M.A.; DIANIN, M.F.V.; VIANNA, D.S.; DAGNINO, D.S.; *New Approaches in Metabolomic Fingerprinting: Improved Extraction Method and Automatic Reduction of RMN Spectra to Essential Data*, Chapter 19,pp. 362-373 2014.

SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J.G.; McALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; *Universal quantitative RMN analysis of complex natural samples*, **Current Opinion in Biotechnology**, 2014, 25: 51-59.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T.; *Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from*

Passiflora subpeltava leaves – A promising species of *Passiflora*, **Industrial Crops and Products**, 2014, 54, 272-280.

THAMMANA, M.; A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC), **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Vol. 5, N° 2, pg.22-28, 2016.

VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H.; *Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids*, **Journal of Chromatography A**, 2016, 1430:16-78.

WOSCH, L.; SANTOS, K.C.; IMIG, D.C.; SANTOS, C.A.M.; *Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II ,A chromatographic profile*, 2017, 27: 40-49.

XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.Z.; WANG, X.; TIAN, R.; UPTON, R.; *Chromatographic fingerprint analysis- a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine*, **Journal of Chromatography**, 2006, 1112: 171-180.

ZOCOLO, G.J.; Minicurso: Princípios e aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), CRQ-IV, São Paulo, Araraquara, 2012.

ZERAIK, M.L.; PEREIRA, C.A.M.; ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H.; *Maracujá: um alimento funcional?*, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Vol.20(3), p.459-471, 2010.

**CAPÍTULO 3 - MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO
PASSIFLORA COM SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS
(NADES) PARA TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE**

RESUMO TERCEIRO CAPÍTULO

A enzima tirosinase catalisa a reação de produção de melanina que se produzida em excesso pode causar problemas de pele e a sua biossíntese pode ser diminuída pela inibição da tirosinase. Assim, a busca por novos compostos inibidores da tirosinase é amplamente investigada, até mesmo porque os compostos já conhecidos e que são usados em agentes de clareamento de pele apresentam alta toxicidade e atividade insuficiente. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi realizar testes de inibição da enzima tirosinase usando a técnica de HPLTC e os solventes NADES para a extração de compostos inibidores da enzima dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora*. Os NADES 1 (ácido málico e cloreto de colina, NADES 2 (ácido málico e glicose , NADES 3 (cloreto de colina e glicose, NADES4 (ácido málico e prolina, e NADES 5 (glicose, frutose e sacarose) e 6 (glicerol, prolina e sacarose) foram classificados em dois grupos químicos distintos de extração de acordo com as análises de PCA. Este último grupo apresentou capacidade de extração dos compostos similar ao solvente metanol, logo, estes solventes NADES são solventes promissores para a substituição do metanol, pois eles são menos tóxicos e biodegradáveis. Ao todo quatro compostos inibidores da enzima foram identificados no teste de inibição por HPLTC pelos seus valores de $R_f= 0,40$, $R_f=0,50$, $R_f= 0,60$, $R_f= 0,65$ e $R_f= 0,70$ foram extraídos dos medicamentos P2, PK, P3, P4, PR e PE pelos solventes NADES. Como o medicamento P2 apresentou nos testes de inibição da enzima tirosinase um maior número de compostos inibidores da mesma ele foi selecionado para os testes com o solvente NADES 6. O solvente NADES foi escolhido para realizar experimentos com adição de água (0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 %) para tais análises, porque era o menos tóxico e mais fácil de confecção, a fim de aumentar a capacidade de extração de tais compostos alvo. O solvente NADES 6 com os diferentes teores de água foi classificado em dois grupos de extração pela análise de PCA, grupo 1 NADES 6 com 0 %, 5 % e 10 % de água e grupo 2 com 15 % e 20% de água. O NADES 6 com 10 % de água apresentou quantidade suficiente de água para aumentar a capacidade de extração dos inibidores da tirosinase do medicamento P2. O composto com

maior capacidade de inibição da enzima de acordo com os testes de HPTLC foi isolado por cromatografia líquida preparativa e foi identificado através dos espectros de ressonância magnética nuclear bidimensional HMBC e HSQC como isovitexina-2"-O- β -D-glicosídeo. Este é o primeiro relato deste composto como inibidor da enzima extraído do medicamento fitoterápico de *Passiflora incarnata*.

Palavras chave: HPTLC, tirosinase, NADES

3.1 INTRODUÇÃO

As diferentes espécies de *Passiflora* possuem as mais variadas atividades biológicas, tais como, ansiolítica, sedativa, narcótica, antioxidante, analgésico, anti-inflamatório, antimicrobiano e anti-tirosinase (FARAG et al., 2016; INGALE et al., 2010; MIRODDI et al., 2013; SARAVANAN et al., 2014; e ZHANG et al., 2013). A enzima tirosinase participa da reação de produção da melanina que se produzida em excesso pode levar a problemas dermatológicos e ao câncer (CHANG et al., 2009, ORHAN et al., 2014 e ZOLGHADRI et al., 2019), assim é importante a busca por compostos que inibam a sua atividade. Além do mais, os compostos conhecidos até o momento e que são usados em cosméticos para o clareamento da pele apresentam alta toxicidade, baixa penetração na pele e atividade insuficiente (MOMTAZ et al., 2018 e SOUZA et al., 2012).

Como já foi relatada a atividade de inibição da enzima tirosinase por flavonoides (TAIBON et al., 2015) extraídos da espécie *P. edulis* (ZHANG et al., 2013), neste trabalho esses compostos foram extraídos dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* com os NADES solventes. Esses solventes foram usados porque eles são solventes verdes constituídos de metabólitos primários das plantas misturados em proporções fixas que podem solubilizar compostos polares e apolares, principalmente os compostos polares porque podem fazer ligação de hidrogênio com estes compostos (CHOI et al., 2011, DAI et al., 2013 e DAI et al., 2015). Assim, para o teste de inibição da enzima com os flavonoides extraídos pelos solventes NADES a HPLTC foi a técnica escolhida, pois com ela foi possível realizar a separação dos flavonoides e ao mesmo tempo fazer o teste de inibição da enzima tirosinase (BRAM et al., 2016 e CHENG et al., 2013).

Com o HPTLC foi possível obter o escaneamento individual dos compostos inibidores da enzima extraídos dos medicamentos de *Passiflora*, porque ele permite uma localização rápida e direta destes compostos (CHENG et al., 2013) ao contrário do que acontece quando o teste é realizado com métodos espectroscópicos onde a informação obtida é dos extratos que possuem ou não compostos inibidores da enzima e não com os compostos individuais como ocorre quando o teste é realizado com HPTLC (ZHOU et al., 2016, CHENG et al., 2014 e WANGTHONG et al., 2007). O método

espectroscópico é indicado para as análises quantitativas (CHENG et al., 2013, PIAO et al., 2002, JONES et al., 2002 e LIU et al., 2015), enquanto que para o escaneamento individual dos inibidores da enzima o HPTLC é mais vantajoso (TAIBON et al., 2015 e WANGTHONG et al., 2007). Além do mais o HPTLC é um método cromatográfico rotineiramente usado para testes de inibição várias enzimas, tais como, acetilcolinesterase (AChE), α e β -glucósidos, lipase e xantina oxidase (XO), além da capacidade de realizar testes antimicrobianos e antifúngicos (CHENG et al., 2013, BRAM et al., 2016, CHOMA et al., 2011, MARSTON et al., 2011 e CIESLA et al., 2015). Logo, ele é usado para vários testes biológicos porque permite testar vários extratos simultaneamente, além dos mais estes testes podem ser facilmente repetidos (CIESLA et al., 2015). Também há a capacidade de realizar a separação dos compostos presentes nestes extratos (BRAM et al., 2016, CIESLA et al., 2015 e POOLE et al., 2015). O HPTLC também é usado para tais finalidades porque é um método barato, de fácil aprendizado e disponível em muitos laboratórios de pesquisa (HEYDEN et al., 2012, DHANESWAR et al., 2015, SHAUYIPROM et al., 2016 e POOLE et al., 2015).

Assim, a busca por novos inibidores da enzima tirosinase foi realizada testando flavonoides que foram extraídos dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* com os solventes NADES usando o HPTLC, pois era possível realizar o teste e também obter a impressão digital dos flavonoides extraídos.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

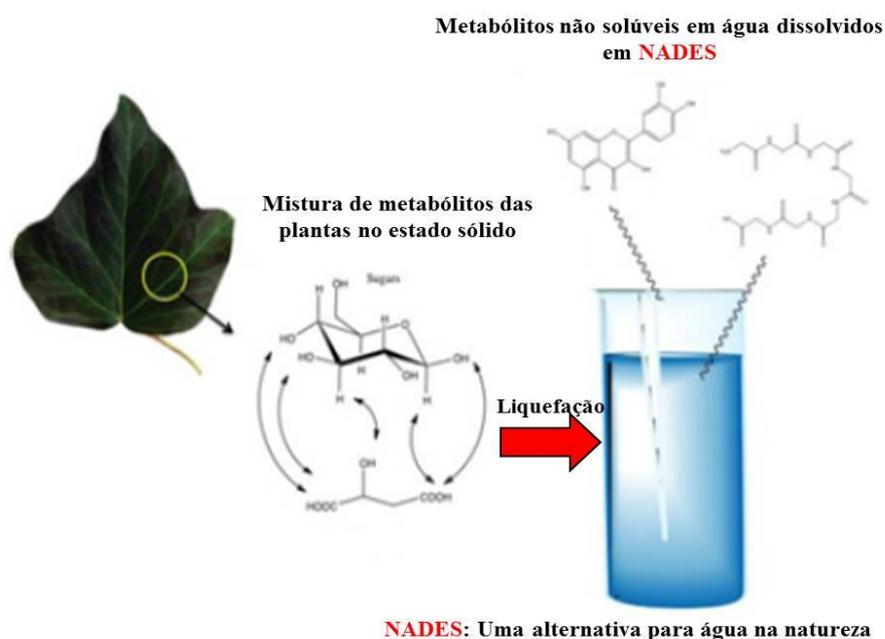
3.2.1 SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS (NADES)

Os NADES podem ser aplicados em diferentes campos de pesquisa como solventes de extração, como por exemplo, em biocatálise e ciências dos materiais, mas são principalmente aplicados para a extração de metabólitos secundários de plantas como os flavonoides, saponinas e carotenoides (RADOSEVIC et al., 2016 e ESPINO et al., 2016).

Os NADES são compostos por metabólitos primários das plantas misturados em proporções estabelecidas. Esses são açúcares, álcoois de

açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos (DAI, 2015). As moléculas que compõem os NADES são moléculas fortemente ligadas, pois são ligadas através de fortes interações intermoleculares, particularmente as ligações de hidrogênio e por isso possuem natureza polar (DAI, 2014 e DAI, 2016). Esta natureza permite que eles sejam capazes de aumentar a solubilidade de compostos fenólicos, como os flavonoides presentes nas plantas (VERPOORTE, 2011 e DAI, 2013). Assim, eles foram usados para a extração dos flavonoides presentes nos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora incarnata* porque os flavonoides são os principais compostos bioativos dessa espécie (CHABARIBERI et al., 2009). Uma ilustração deste tipo de solvente é mostrada na figura 1 abaixo.

Figura 1 - Ilustração da composição dos solventes eutéticos naturais profundos (NADES) adaptado de DAÍ et al., 2013.



A presença da água em sua composição permite que as suas propriedades sejam ajustadas para diferentes finalidades, como por exemplo, para processamento de alimentos, reações enzimáticas, produtos farmacêuticos e cosméticos (DAI, 2013 e DAI, 2015). Esta classe de solventes possui uma série de propriedades que os tornam interessantes por possuírem volatilidade negligenciável até mesmo abaixo de zero; alto poder de solubilização para uma vasta extensão de compostos, principalmente os compostos pouco ou pobremente solúveis em água; alta capacidade de extração e solubilização de

compostos naturais. Além de serem biodegradáveis, sustentáveis, de baixo custo e de preparação simples (CHOI, 2011; DAI, 2013 e DAI, 2015).

Os NADES podem ser considerados como o terceiro solvente presente em células e organismos vivos, além da água e dos lipídios. Eles também estão envolvidos na biossíntese, estocagem e transporte dos metabólitos secundários nas plantas. A formação deles nos organismos vivos talvez seja um mecanismo de defesa das plantas para produzir água necessária a sobrevivência em condições extremas, como a seca e o frio; temperaturas muito baixas ou altas e ao estresse salino (CHOI, 2011; DAI, 2013 e DAI, 2015).

Para a análise dos compostos extraídos dos medicamentos fitoterápicos da planta *Passiflora* pelos solventes NADES de modo rápido, simples e fácil usou-se a técnica de cromatografia em camada fina de alta eficiência do inglês (high performance thin layer chromatography - HPTLC) que será explicada a seguir, pois é possível fazer uma associação entre os extratos NADES obtidos com esta técnica.

3.2.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPTLC)

A cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) é amplamente usada em diversas áreas de estudo, como por exemplo, suplementos alimentares, amostras clínicas e biológicas, poluentes ambientais como análise de água e solo, detecção e quantificação de pesticidas residuais em frutas, análises de comidas, monitoramento de drogas e em análises farmacêuticas (HEYDEN, 2012 e BOUKLOUZE, 2017). Além de ser uma poderosa ferramenta para detectar adulteração em medicamentos (HARSA, 2011), identificar os constituintes dos medicamentos à base de extratos de plantas (DHANESWARM, 2015) e obter a impressão digital de extratos de plantas (PEREIRA, 2004; SHUAYPROM, 2016 e BLINGH, 2012). Assim, a HPTLC serve como uma técnica de rotina de vários tipos de compostos (PEREIRA, 2004 e HARSHA, 2011).

“A cromatografia é um método de separação físico-químico que consiste na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase

estacionária“ (DEGANI, 2008). Assim, a HPTLC é um método cromatográfico de separação de compostos como outro qualquer que possui uma fase estacionária ou adsorvente e uma fase móvel ou eluente, podendo ser usada para análises qualitativas e quantitativas de misturas (ANDOLA, 2010, HEYDEN, 2012 e SHUAYPROM, 2016). Ela pertence à cromatografia planar clássica, assim como a cromatografia em camada fina convencional (do nome em inglês thin layer chromatography – TLC) que possuem como forma de separação dos compostos o fluxo capilar (LAYLOFF, 2011). A forma de separação (fluxo capilar ou fluxo forçado), a natureza da fase estacionária (papel ou em camada delgada) e o mecanismo de separação (adsorção, partição, troca iônica e tamanho de exclusão) são alguns critérios pelos quais as técnicas da cromatografia planar (TLC e HPTLC) podem ser divididas (HARSHA, 2011).

A HPLTC surgiu em 1975 como um aperfeiçoamento da técnica de TLC convencional (HEYDEN, 2012), o que levou a uma série de alterações na técnica de TLC que podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características das placas de TLC e HPTLC (POOLE, 2011).

Parâmetros	TLC	HPTLC
Tamanho da placa (cm)	20 x 20	10 x 20
Espessura da camada (mm)	0,1-0,25	0,1 ou 0,2
Tamanho das partículas (µm)	10-12	4-6
Extensão das partículas (µm)	5-20	4-8
Tempo de separação (min)	30-200	3-20
Altura média da placa (µm)	35-75	23-25
Volume típico de aplicação (µl)	1-5	0,1-0,5
Diâmetro da mancha (mm)	3-6	1-1,5

Conforme observamos na tabela 1 as alterações sofridas do TLC para o HPTLC foram em relação ao tamanho da placa, espessura da camada, tamanho das partículas, tamanho de extensão das partículas, tempo de separação, altura média da placa, volume típico de aplicação das amostras na forma de manchas e diâmetro das manchas (POOLE, 2011). Essas modificações no método original

levaram a placas com melhor resolução e que por consequência proporcionaram uma melhor separação dos compostos (HARSHA, 2011), menor tempo de análise e alta sensibilidade (POOLE, 2015). Além das modificações outros parâmetros apresentados na tabela 2 podem ser usados para diferenciá-las.

Tabela 2- Comparação entre TLC e HPTLC (ANDOLA, 2010).

Parâmetros	TLC	HPTLC
Eficiência	Menor	Alta devido ao pequeno tamanho das partículas
Tempo de análise	Demorado	Tempo de análise relativamente curto
Suporte sólido (adsorvente)	Sílica gel e alumina	Ampla escolha de fases estacionárias como sílica gel para fase normal e C ₈ e C ₁₈ para fase reversa
Câmara de desenvolvimento	Exige maior quantidade de fase móvel	Exige menor quantidade de fase móvel

Tabela 2 – completa.

Parâmetros	TLC	HPTLC
Aplicação das amostras	Manual	Aplicador automático
Escaneamento	Não é padrão	Uso de escâner que varre todo o cromatograma qualitativamente e quantitativamente.

Assim, de acordo as tabelas 1 e 2 podemos afirmar que a HPTLC oferece melhor acurácia e reprodutibilidade se comparada ao TLC (HARSHA, 2011), pois a alteração na natureza das partículas que compõe a camada adsorvente, além das alterações que compreendem o método cromatográfico, como por exemplo, menor tempo de análise, natureza do adsorvente, quantidade de fase móvel que depende da forma da câmara de desenvolvimento, aplicação da amostra que é automático e o escaneamento das manchas padronizado que pode ser realizado no HPTLC, fornece a ele uma melhor eficiência comparada ao TLC com inúmeras vantagens.

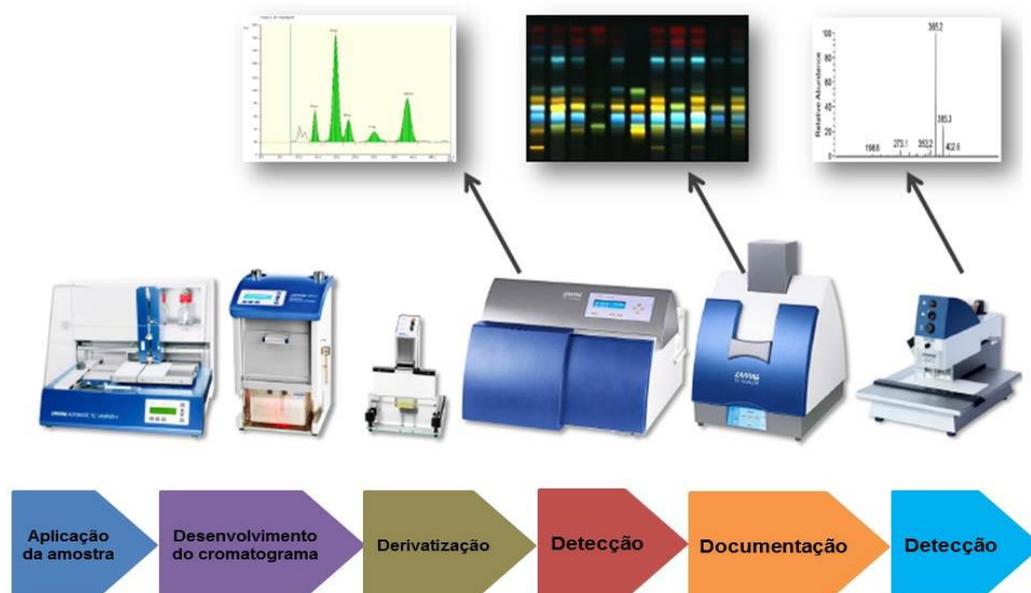
As vantagens da HPTLC são: o processo de separação é rápido e fácil (HEYDEN, 2012; DHANESWAR, 2015 e SHAUYIPROM, 2016); é um método econômico, pois uma placa custa 15 US\$ (ou R\$ 60) e ela pode ser usada para realizar a separação simultânea de até 18 compostos (LAYLOFF, 2011, SHERMA, 2010; HEYDEN, 2012; DHANESWAR, 2015 e BLIGH, 2012) característica única da técnica que não é observada em nenhuma outra (DHANESWAR, 2015); as placas de HPTLC são descartáveis sendo substituídas a cada experimento e diferentemente das colunas cromatográficas usadas em HPLC não precisam de limpeza ou regeneração entre as corridas (HEYDEN, 2012); é uma técnica de fácil aprendizado e está amplamente disponível em diversos laboratórios (POOLE, 2015); todas as fases móveis comumente usadas em HPTLC estão disponíveis também em HPLC (COLLINS, 2010); os reagentes possuem cores específicas que podem ser usados para

detectar as manchas de cada um dos compostos separados ou podem até serem reveladores universais; a identificação do analito pode ser realizada de modo on-line ou off-line com métodos espectroscópicos, como por exemplo, MS) e IV), assim possuem diversas plataformas de detecção que podem ser adequadas ao tipo de analito a ser analisado (HEYDEN, 2012); o desenvolvimento da interface HPTLC-MS proporcionou uma evolução ao HPTLC em termos de identificação dos compostos o que a torna similar ao HPLC-MS (DHANESWAR, 2015).

Antes de realizar a análise de HPTLC é preciso escolher a fase móvel e a fase estacionária que são dependentes do tipo de analito a ser analisado. A fase estacionária pode ser de sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3), celulose ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n, gipsita ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou poliamidas, onde a sílica pode ser de fase normal (sílica polar com grupos silanóis) ou de fase reversa (sílica apolar com alcanos C_8 ou C_{18} ou alquenos, por exemplo). Ela também pode ser modificada para obter uma camada ácida, básica ou neutra (HEYDEN, 2012 e SHERMA, 2010) podendo então ser ajustada de acordo com a natureza do analito que se deseja separar. A fase móvel pode ser de um único solvente ou de um gradiente de solventes. Os solventes mais usados são: éter dietílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), tetrahidrofurano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) e clorofórmio (CHCl_3) (HEYDEN, 2012). O analito será separado de acordo com a afinidade entre estas duas fases e a razão da distância percorrida por ele e pelo eluente dá o fator de retenção (R_f) (DEGANI, 2008 e HEYDEN, 2012).

Os passos gerais da análise de HPTLC compreendem em seis etapas: aplicação da amostra na camada adsorvente, desenvolvimento (separação), derivatização cromatográfica, detecção, documentação e detecção por análise de técnicas espectroscópicas convencionais, como por exemplo, espectrometria de massas, conforme pode ser visualizado na figura 2 abaixo.

Figura 2 - Esquema de análise de amostra na cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).



Fonte: www.camag.com, acessado em 17/03/19.

A primeira etapa consiste na aplicação da amostra na placa cromatográfica (camada adsorvente) que pode ser realizada com o uso de aplicadores automáticos (POOLE, 2015). A aplicação da amostra é um passo muito crítico a fim de obter uma boa resolução em análises quantitativas, e a forma de aplicação das amostras pode ser realizada no formato de bandas ou manchas, em ambos os formatos de aplicação há o controle do tamanho da banda ou da mancha e do espaçamento entre elas (POOLE, 2015) o que pode ser observado em muitos trabalhos que fazem uso desta técnica, como por exemplo, HEYDEN, 2012; BHATI, 2009; SHAH, 2007 e WANKHEDE, 2015. A aplicação da amostra no formato de banda é mais reproduzível do que a aplicação no formato de mancha, pois uma vez que a amostra é aplicada no formato de manchas levam ao alargamento das mesmas e guiam para uma pobre resolução, o que não acontece na aplicação no formato de banda (HEYDEN, 2012).

A segunda etapa é o desenvolvimento que consiste na separação dos compostos pela migração diferencial deles na direção do fluxo da fase móvel

(POOLE, 2015). Existem vários tipos de desenvolvimento e são eles: ascendente, descendente, bidimensional, desenvolvimento múltiplo, desenvolvimento múltiplo automático, radial, antirradial e de fluxo forçado (POOLE, 2015 e HEYDEN, 2012).

A técnica de desenvolvimento ascendente é o tipo mais comumente usados em HPTLC, onde a placa cromatográfica com a amostra é introduzida na câmara de desenvolvimento com uma fase móvel que penetra a placa até subir por capilaridade. Assim, as substâncias migram e se separam (HEYDEN, 2012). Neste tipo de desenvolvimento a velocidade da fase móvel e os valores de R_f podem ser diferentes se forem usadas câmaras de desenvolvimento de formatos diferentes com uma mesma fase móvel (POOLE, 2015). Os tipos e formatos das câmaras de desenvolvimento podem também melhorar o desenvolvimento possibilitando, por exemplo, uma pré-equilíbrio reprodutível com solvente de vapor e baixo consumo de solvente. Já na técnica de desenvolvimento descendente a placa é introduzida na câmara cromatográfica com a fase móvel do lado superior da placa. Os desenvolvimentos ascendente e descendente, que são separações realizadas baseando-se no fluxo capilar, ainda continuam sendo os mais populares, mas também serve para limitar o desempenho da separação, pois as forças capilares são insuficientes para fornecer uma velocidade ideal do fluxo na camada adsorvente para altos desempenhos, onde uma velocidade constante ao longo da distância de desenvolvimentos é exigida (POOLE, 2011). À medida que fase móvel diminui a sua velocidade a partir da distância inicial o progresso do solvente é tão lento que as zonas das amostras expandem devido à rápida difusão. Assim, um maior tempo de separação não significa uma melhor separação, na verdade o desempenho da separação diminui e eventualmente a fase móvel vai parar de se mover quando as forças capilares não forem mais suficientemente fortes para mover a fase móvel na camada adsorvente. Pequenas melhorias na separação dos compostos através do fluxo capilar podem ser feitas reduzindo o tamanho das partículas para aumentar a permeabilidade das camadas e também há a possibilidade de redução da espessura das camadas para aumentar a velocidade de fase móvel sem afetar a amostra (POOLE, 2011).

A terceira etapa do HPTLC compreende na derivatização dos compostos que foram separados na placa. As reações de derivatização são reações

químicas seletivas para substâncias com pobre capacidade de absorção nas regiões ultravioleta-visível (UV-VIS) ou até mesmo para obter uma seletividade adicional de um determinado grupo ou uma determinada família de compostos. Estas reações podem ser feitas antes da separação dos compostos (aplicação de um reagente em uma camada acima da zona de aplicação da amostra) o que é chamado de derivatização pré-cromatográfica. Em alguns poucos casos pode ser realizada durante a separação dos compostos pela adição de um reagente na fase móvel e como ocorre na maioria dos casos à reação de derivatização pode ser feita depois da separação na placa o que é chamado de derivatização pós-cromatográfica. As vantagens da derivatização pós-cromatográfica são que a separação dos compostos não é afetada pela derivatização, e todos os padrões e as amostras são derivados simultaneamente (POOLE, 2015).

Assim, a quarta etapa do HPTLC é a detecção e documentação que é realizada através de aparelhos chamados densitômetros (SHERMA, 2010 e HEYDEN, 2012). Os densitômetros são aparelhos capazes de realizar a quantificação *in situ* e podem operar na forma de escâneres monocromáticos, escâneres de arranjo de diodo e analisadores de imagem (POOLE, 2015). Em todos estes aparelhos as fontes de luz para o ultravioleta são lâmpadas de deutério, enquanto que para luz visível são lâmpadas de. Muitos destes instrumentos empregam monocromadores para a seleção de um determinado comprimento de onda, enquanto que outros deles empregam a gravação dos espectros em comprimentos de onda duplos ou múltiplos (arranjo de diodo). E há a possibilidade de obter os espectros nos modos absorção e reflexão (ANDOLA, 2010 e POOLE, 2015). Uma vez realizado o escaneamento densitométrico as zonas identificadas e os seus respectivos valores de R_f podem ser gravados *in situ* pela absorção UV-VIS com os densitômetros. O software do densitômetro obtém as áreas ou as alturas dos picos da amostra e do padrão (SHERMA, 2010).

A quarta etapa compreende uma nova detecção que pode ser realizada ou não dependendo do tipo de análise a fim de confirmar a identidade do composto. A detecção pode ser realizada por técnicas como RMN, IV, MS ou para um bioensaio (HARSHA, 2011 e HEYDEN, 2012).

De modo geral então quando se deseja realizar uma análise quantitativa por HPTLC todos os passos são importantes para obter dados precisos e reproduzíveis. Os parâmetros que afetam a medida quantitativa são: tempo de preparação da amostra, condições de estabilidade do adsorvente antes e depois do desenvolvimento, derivatização pós-cromatográfica (tempo e temperatura de aquecimento) e o comprimento de onda da detecção densitométrica (FODOR-FERENCZI, 2011). Assim, a HPTLC compreende operações simples em várias etapas que em conjunto constituem-se na separação, identificação e quantificação dos compostos usando diferentes plataformas de detecção.

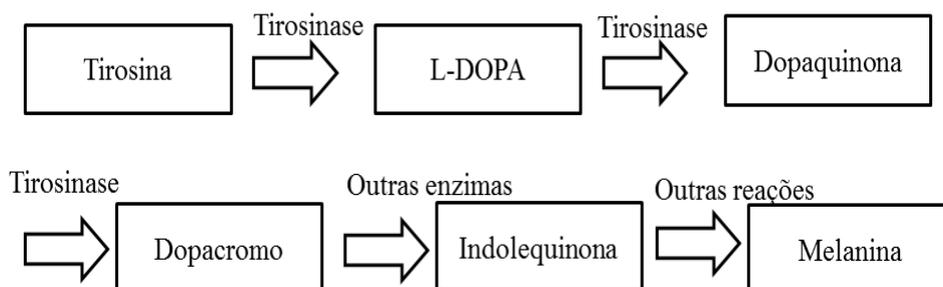
Assim, foi obtido a impressão digital da espécie de *Passiflora* presentes em medicamentos fitoterápicos com o uso da técnica HPTLC) com os extratos obtidos com os solventes NADES. A escolha da técnica de HPTLC foi porque em geral as técnicas cromatográficas são usadas para a análise de flavonoides (CHABARIBERI, 2009 e MARCHART, 2003) e é possível associar a composição dos solventes NADES com o reagente de derivatização no HPLTC para a identificação de compostos alvo.

3.2.3 ENZIMA TIROSINASE

Os flavonoides são conhecidos por possuírem atividade de inibição contra algumas enzimas, tais como: lipoxigenase, ciclooxigenase, monooxigenase, xantina oxidase e tirosinase (MOMTAZ et al., 2008 e KIM et al, 2016). A inibição das enzimas por flavonoides é possível devido a sua interação com os radicais livres gerados no sitio ativo da enzima ou da interação do íon metálico no domínio catalítico da enzima. Os flavonoides possuem a capacidade tungstênio de inibir a enzima tirosinase devido as hidroxilas presentes em seus anéis A e B em seu esqueleto. O número e a posição das hidroxilas influenciam na capacidade de inibição. Por outro lado, os flavonoides metilados ou glicosilados exibem menor efeito inibitório (KIM et al, 2016). Uma enorme variedade de compostos derivados de flavonoides e os flavonoides têm sido estudados para a atividade de inibição da a enzima tirosinase (ORHAN et al., 2014 e CHANG et al., 2009).

A tirosinase é uma enzima muito importante para a biossíntese da melanina no processo denominado melanogênese. Ela tem a função de catalisar a orto-hidroxilação de monofenóis (pela ação da monofenolase) a o-difenóis (L-DOPA) e a subsequente oxidação de o-difenóis (pela ação da difenolase) a o-quinonas (Dopaquinona) que depois de uma série de reações enzimáticas e não enzimáticas levam a formação da melanina conforme exposto na figura 3 abaixo (CHANG, 2009, ORHAN, 2014 e MOMTAZ et al., 2008). Assim, os testes de inibição da enzima tirosinase constituem-se em uma abordagem bem comum para investigar os problemas de pigmentação da pele, pois esta enzima catalisa a etapa limitante da reação de pigmentação da pele (MOMTAZ et al., 2008).

Figura 3 – Biossíntese da melanina (ADAPTADO de CHANG et al., 2009).



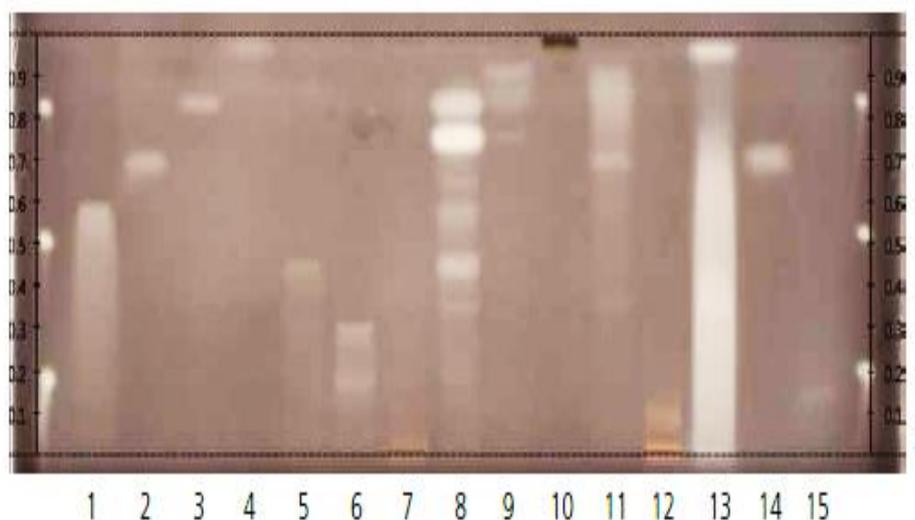
A melanina é responsável pela pigmentação, pelos padrões de cor da pele e do cabelo dos mamíferos e pela proteção dos raios UV do sol na pele dos humanos. Sua acumulação excessiva na pele pode causar vários problemas dermatológicos de hiperpigmentação ou doenças como melanomas, melasma e sardas por exemplo. Nas plantas, frutas e fungos a tirosinase é responsável pelo seu escurecimento, o que causa uma diminuição da qualidade nutricional dos alimentos e sua conseqüente desvalorização econômica. Assim o estudo de inibidores da tirosinase é importante para produtos cosméticos, medicinais e para os alimentos (CHANG, 2009 e ORHAN, 2014), especialmente para a indústria de cosméticos devido ao efeito de clareamento da pele, o que faz com que muitos produtos já produzidos e outros ainda sejam estudados para superar os problemas no processo da melanogênese (MOMTAZ et al. 2008 e ORHAN, 2014).

Já existem inibidores clássicos desta enzima, como o ácido kójico ($C_6H_6O_4$), conhecido como um forte inibidor da tirosinase por possuir a capacidade de ligar-se ao sítio ativo dela, ou seja, ele pode formar um quelato com o cobre presente em sua estrutura. Isto pode explicar o seu efeito inibidor (LIU et al., 2015 e CHANG et al., 2009). Nas pesquisas pela procura de outros inibidores da tirosinase a enzima é extraída do cogumelo *Agaricus. bisporus*, disponível comercialmente (CHANG et al., 2009 e ORHAN et al., 2014). Além do mais o ácido kójico que é amplamente usado como agente clareador tem sido apontado por causar vários efeitos colaterais graves, mais ainda sim é usado em medicamentos tópicos porque é uma alternativa a tratamentos cirúrgicos e a laser (ZHOU et al., 2016). Até o momento não há relatos de um novo medicamento ou outro tratamento mais eficaz para os problemas de pele. Deste modo a busca por novos inibidores da tirosinase ainda é investigada (ZHOU et al., 2016), porque apesar de haver várias pesquisas sobre agentes clareadores os compostos conhecidos ainda apresentam alta toxicidade, baixa estabilidade e baixa penetração na pele, além da atividade insuficiente (MOMTAZ et al., 2008).

Existem vários protocolos de inibição da enzima tirosinase, tais como a espectroscopia de UV, cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e métodos eletroforéticos, porém estes métodos apresentam várias desvantagens tais como pré-tratamentos complexos das amostras, equipamentos caros, grande consumo de amostra e dificuldade de dissolver o composto insolúvel em água e as soluções aquosas da enzima acabam limitando as análises de rotina (ZHOU et al., 2016). Além do mais os testes espectroscópicos com a espectroscopia de UV ou o modelo usando células de melanoma para a inibição da enzima tirosinase não exibem uma atividade individual de cada um dos compostos presentes em uma amostra (ZHOU et al., 2016 e WANGTHONG et al., 2007). Assim, um método alternativo para o ensaio de inibição que integra a separação cromatográfica com a atividade biológica *in situ* constitui-se no método de TLC autobiográfico (ZHOU et al., 2016) ao qual permite um escaneamento individual dos compostos inibidores da enzima. Este ensaio é realizado na placa de TLC com os compostos já separados, com a enzima e com o substrato L-DOPA (WANGTHONG et al., 2007). Os compostos

inibidores da tirosinase aparecem como manchas brancas em contraste ao fundo marrom da placa (ZHOU et al., 2016, TAIBON et al., 2015, WANGTHONG et al., 2007 e CARCÍA et al., 2015) de TLC de acordo com a figura 4.

Figura 4- Exemplo de um ensaio autobiográfico para a inibição da enzima tirosinase usando HPLTC (TAIBON et al., 2015).



Além do mais, o método é baseado na reação entre a enzima e o substrato na placa de HPTLC, o que permite a comparação de vários extratos em uma mesma placa ao mesmo tempo, permite a discriminação entre os compostos inibidores e ativadores da enzima através de uma detecção visual e permite obter a informação do composto inibidor da enzima e não do extrato que contém o composto inibidor como acontece com os métodos espectroscópicos convencionais de forma simples e fácil (TAIBON et al., 2015 e WANGTHONG et al., 2007). Como única desvantagem do método é a presença dos solventes orgânicos usados na fase móvel, mas que pode ser eliminado com a evaporação do solvente da placa e então posteriormente o teste de inibição pode ser realizado espirando a enzima e o substrato na placa (WANGTHONG et al., 2007). Como uma maneira de diminuir o alto consumo da enzima tirosinase e problemas de solubilidade do substrato L-DOPA, o ensaio autobiográfico com HPTLC foi proposto por TAIBON et al., 2015, porém este teste não é quantitativo (ZHOU et al., 2016). Um método para o ensaio autobiográfico usando HPTLC

para fins qualitativos e quantitativos pode ser consultado em ZHOU et al., 2016. Os testes quantitativos podem ser realizados através do método espectroscópico onde se prepara soluções da enzima e do substrato L-DOPA (branco) e soluções da enzima, do substrato L-DOPA e do composto que inibe a enzima (amostra). A porcentagem de inibição é então calculada. A absorbância é medida em 450 nm para a detecção do dopacromo um dos produtos formados na síntese da melanina onde a enzima atua. Assim, se houver a produção deste composto e sua absorção for detectada em 450 nm, significa que o composto testado não está inibindo a enzima. Os protocolos do ensaio quantitativo para a inibição da enzima podem ser obtidos em PIAO et al., 2002, JONES et al., 2002, LIANG et al., 2012 e LIU et al., 2015.

Deste modo o ensaio autobiográfico de inibição da enzima tirosinase usando HPTLC constitui-se em um método com vantagens se comparados aos métodos convencionais, pois é possível separar e verificar o composto inibidor da enzima pela sua localização na placa de HPTLC, ao contrário dos demais métodos espectroscópicos convencionais onde a atividade inibitória obtida é do extrato como um todo e não de um determinado composto. Assim, este teste foi realizado através dos extratos dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidos com os solventes NADES para a investigação da presença de inibidores da tirosinase.

3.3 OBJETIVOS

- ✓ Obter as impressões digitais dos medicamentos fitoterápicos nomeados como *Passiflora*;
- ✓ Verificar o perfil da extração dos seis diferentes NADES e em metanol;
- ✓ Verificar a presença dos flavonoides marcadores da espécie de *Passiflora*;
- ✓ Testar a inibição da enzima tirosinase.

3.4 METODOLOGIA

A metodologia de trabalho foi dividida em quatro partes: a primeira compreendeu no preparo dos solventes NADES, a segunda dos extratos NADES com os medicamentos fitoterápicos e a terceira na obtenção do perfil de extração dos solventes com o HPTLC e teste de inibição da enzima tirosinase e quarta parte no isolamento dos compostos presentes na amostra do medicamento fitoterápico por HPLC e elucidação do composto inibidor da enzima por RMN c. Todas as etapas da metodologia realizada serão descritas nos itens seguir 3.4.1.1 até 3.4.1.11. As amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* analisados são as mesmas descritas no capítulo anterior.

3.4.1 PREPARO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CONTENDO *PASSIFLORA* PARA A EXTRAÇÃO COM SOLVENTES NADES

Para a extração dos compostos presentes nos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* com os solventes NADES várias etapas foram necessárias e elas serão descritas nos itens a seguir.

3.4.1.1 Metodologia de preparo dos Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES)

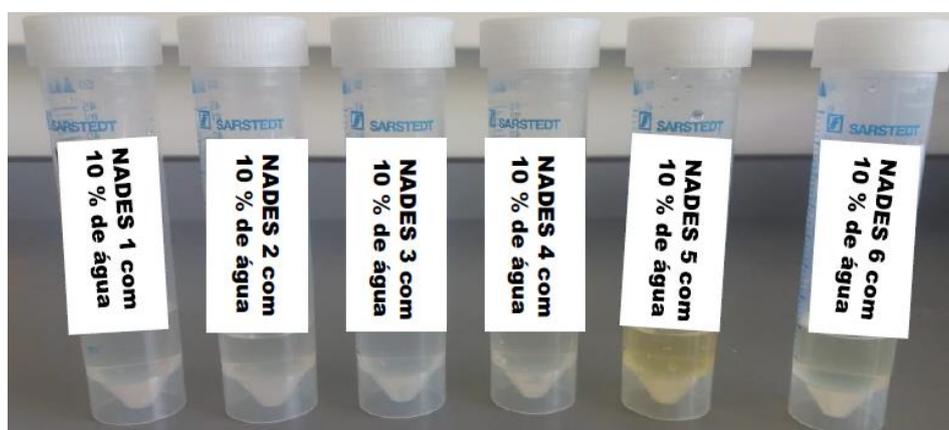
A composição de cada um dos seis solventes NADES preparados encontra-se na tabela 3. Esta composição já é determinada de acordo com a literatura.

Tabela 3 - Composição e razão molar usada dos NADES.

Número	Composição NADES	Razão molar
1	Ácido málico-cloreto de colina	(1:1)
2	Ácido málico-glucose	(1:1)
3	Cloreto de colina-glucose	(5:2)
4	Ácido málico-prolina	(1:1)
5	Glucose-frutose-sucrose	(1:1:1)
6	Glicerol-prolina-sucrose	(9:4:1)

O modo de preparo dos solventes NADES realizado foi através da mistura de dois compostos sólidos em um frasco de tampa sob aquecimento a 40 °C e agitação em banho de água, até a formação de um líquido límpido (DAI, 2013; DAI, 2015 e DAÍ et al., 2016). Todos os NADES foram preparados com 10 % de água em sua composição (fig 5) para avaliar a capacidade da extração.

Figura 5 – Solventes NADES 1, 2, 3,4, 5 e 6.

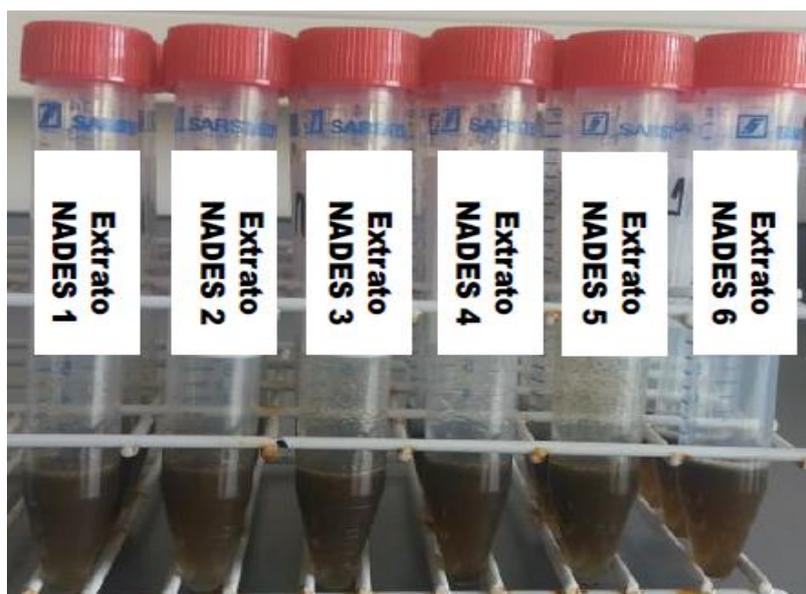


Em seguida o NADES de composição número 6 foi selecionado para variar as concentrações de água de 0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 %.

3.4.1.2 Metodologia de preparo dos extratos dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* por solventes NADES e metanol

Para realizar a extração dos compostos presentes nos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* pesamos 70 mg do extrato da planta que estava dentro da capsula do comprimido do medicamento em um tubo Falcon de 15 mL e transferimos com o auxílio de uma pipeta volumétrica 2,0 ml do solvente NADES com 10 % de água. Em seguida a mistura no tubo Falcon foi para o vortex. Depois para o banho-maria a 40 °C por 1h e posteriormente foi levada ao ultrassom por mais 30 min. Em seguida foi centrifugada a 3500 rpm por 60 min (fig 6) (DAI, 2013; DAI, 2015 e DAI, 2016).

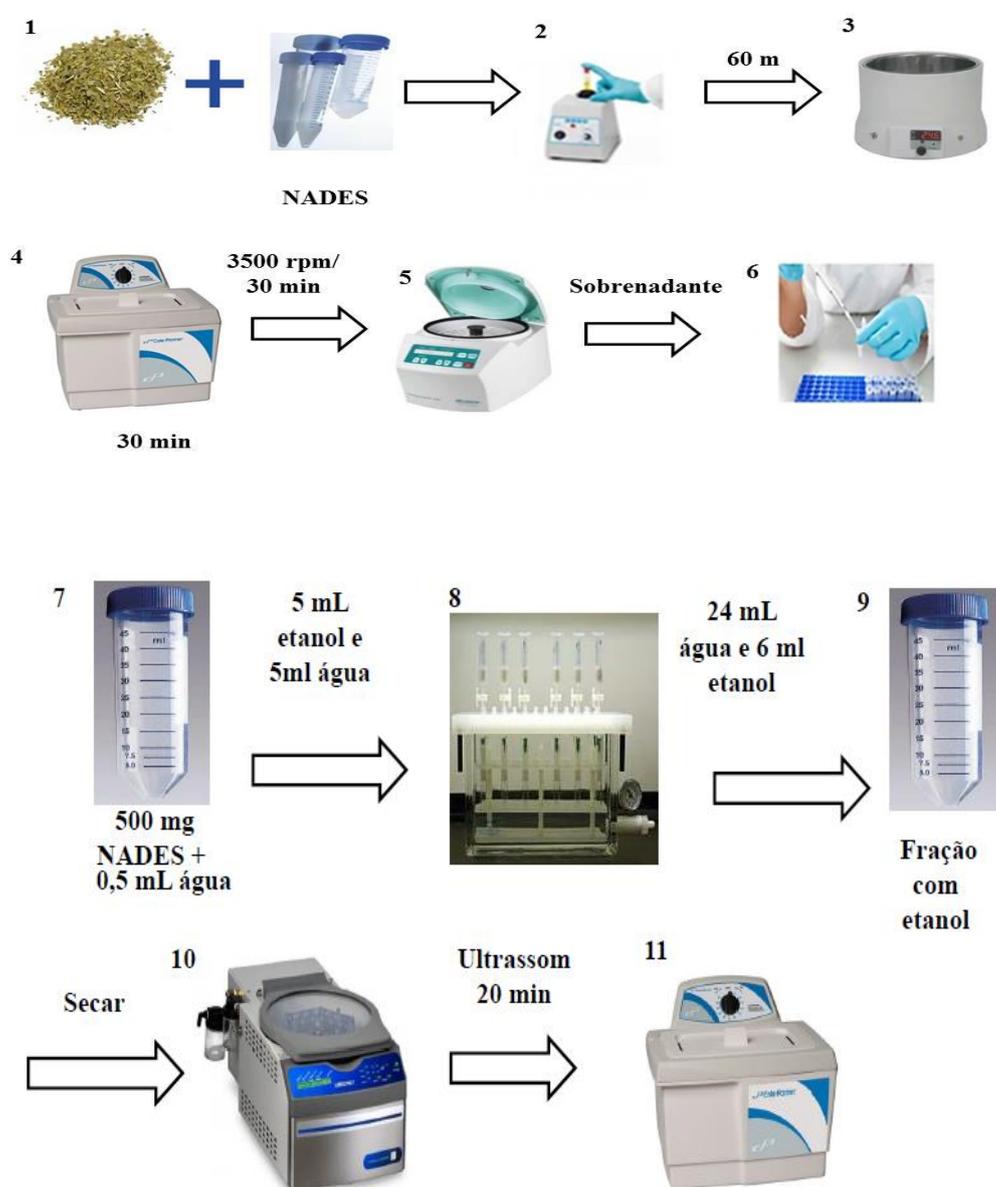
Figura 6 – Extratos dos medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* com solventes NADES 1, 2, 3,4, 5 e 6.



Depois 500 mg do sobrenadante foi transferido com o auxílio de uma pipeta volumétrica para um novo tubo Falcon e sua massa foi conferida em uma balança. A essa massa do extrato NADES foi adicionado 500 uL de água e em seguida foi levado ao vortex para solubilização. Depois a remoção do NADES dos compostos por ele extraídos foi realizada em uma etapa de extração por fase sólida (SPE). O cartucho HLB foi colocado em um coletor a vácuo e pré-condicionado com 5 mL de água seguido de 5 mL de etanol. Depois o cartucho foi carregado com o extrato NADES e posteriormente ele foi lavado com 24 mL

de água e em seguida eluído com 6 mL de etanol para um tubo Falcon. O etanol eluído foi transferido para tubos eppendorf e seco em uma centrífuga a vácuo. Depois 1 mL de metanol foi transferido com uma pipeta volumétrica para os tubos eppendorf e em seguida foi levado ao ultrassom por 20 min para solubilização e então levado para a análise de HPTLC. Um esquema do protocolo de extração usado encontra-se na figura 7. Este mesmo procedimento de preparação foi repetido para cada um dos seis solventes NADES testados.

Figura 7 - Protocolo de extração dos compostos presentes na planta (DAÍ et al., 2013 e LIU et al., 2017).



Os extratos preparados com metanol foram obtidos misturando 30 mg do extrato da planta que estava dentro da capsula do comprimido do medicamento para um tubo eppendorf e transferimos com o auxílio de uma pipeta volumétrica 1 mL de metanol, em seguida a mistura foi agitada a no vortex por 5 min, depois no ultrassom por mais 10 min e posteriormente foi para o banho ultrasônico por mais 20 min. Em seguida foi centrifugado por 10 min e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi usada para as análises de HPTLC. Tanto os extratos NADES quanto os extratos metanólicos foram preparados em triplicata.

3.4.1.3 Preparo das soluções de referência dos flavonoides

As soluções de referência dos flavonoides (isoorientina, isovitexina, vitexina e orientina) e o reagente de derivatização 2-aminoetildifenilborato foram preparados em metanol. Para as soluções de referências as concentrações foram 0,5 mg/mL e para o reagente 2-aminoetildifenilborato 10 mg/mL em metanol.

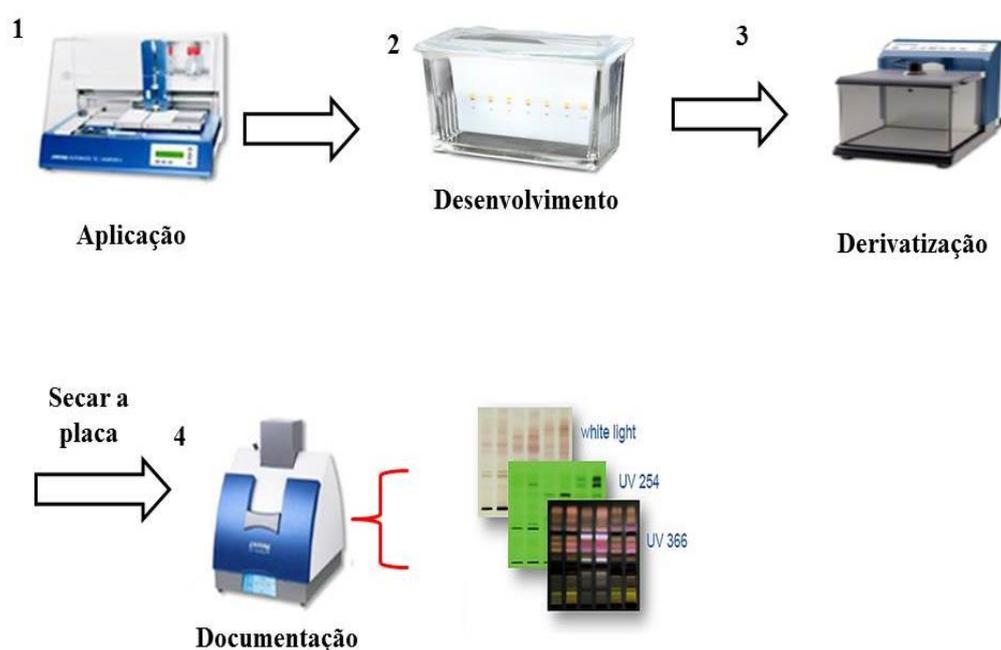
3.4.1.4 Preparo das soluções para o teste de inibição da enzima tirosinase

Uma solução tampão de pH=6,8 foi preparada com 100 mL de uma solução de Na₂HPO₄ 20 mM e 66,6 mL de uma solução de KH₂PO₄ 20 mM. A solução do substrato L-DOPA (levodopa) foi preparada dissolvendo 11,75 mg de L-DOPA com a solução tampão contendo 1% de Triton-X. Essa solução em seguida foi levada para o ultrassom para agitação por 40 min. Inicialmente uma solução da enzima com atividade de 6000 U/mL foi preparada pesando 2,23 mg da enzima tirosinase em um eppendorf e 1 mL da solução tampão foi transferido para o eppendorf com uma pipeta volumétrica. Em seguida alíquotas de 100 uL da solução da enzima foram transferidos para 10 tubos eppendorf que foram estocados a - 20 °C em um freezer. Em seguida em um tubo eppendorf com a alíquota de 10 uL da enzima foi separado para análise e 1,4 mL da solução tampão foi adicionada com uma pipeta volumétrica para que a solução da enzima tivesse a atividade de 400 U/mL. As soluções de controle positivo L-ascórbico e ácido benzoico foram preparadas em concentrações de 2 mg/mL em metanol.

3.4.1.5 Metodologia da análise em cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC)

Um esquema geral da análise realizada por cromatografia em camada fina é mostrado na figura 8.

Figura 8 - Esquema da metodologia usada na cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).



Fonte: (www.camag.com, acessado 02/03/2018).

A aplicação de 10 µL dos extratos de *Passiflora* e das soluções padrões dos flavonoides nas placas de sílica (sílica gel 60, F254, Merck, 20 x10 cm e/ou 10 x 10 cm) foram realizadas com o uso de um amostrador automático CAMAG (ATS 4) com seringas 100 µL Hamilton. As amostras foram aplicadas no modo spray em formato de bandas com o uso do gás nitrogênio. O auto aplicador da CAMAG foi controlado pelo software WINCATS. Em todas as placas a ordem de aplicação foi à mesma, primeiro o extrato metanólico, depois o extrato NADES e por último as soluções com os compostos de referência. Em seguida as placas

foram levadas para eluição da fase móvel em uma câmara de desenvolvimento de dupla fenda com a seguinte fase móvel: acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água na proporção de volume (100:11:11:27) em uma câmara previamente saturada por 20 min. Depois a placa foi seca e derivatizada com 2 mL 2-aminoetildifenilborato usando o instrumento de derivatização e posterior detecção através do visualizador TLC (CAMAG) com a radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm. 3.4.1.6 Seleção da amostra do medicamento fitoterápico de *Passiflora*

As amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidas com os extratos metanólicos (15 µL) foram (escolhidas entre onze marcas diferentes medicamentos fitoterápicos *Passiflora*) aplicadas contendo onze bandas em placa HPTLC. Na placa de 20 x 10 cm foram aplicadas as bandas de 6,0 mm a uma distância de 10 mm da borda inferior da placa e 18 mm das bordas esquerda e direita com a distância entre as bandas de 16,4 mm. Estas placas foram desenvolvidas utilizando a fase móvel acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água na proporção de volume (100: 11: 11: 27) em câmara previamente saturada por 20 min e em seguida as placas foram secas. Em seguida elas foram derivatizadas com 2 mL de 2-aminoetildifenilborato utilizando um instrumento de pulverização.

3.4.1.6 Ensaio autobiográfico de inibição da enzima tirosinase em amostras de medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora*

As amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidas com os extratos metanólicos (15 µL) contendo 13 bandas foram aplicadas em uma placa de HPTLC 20 x 10 cm em bandas de 6,0 mm e aplicadas a uma distância de 10 mm da borda inferior da placa e 18 mm da esquerda e as bordas direitas com distância entre as bandas de 12,6 mm. A placa foi desenvolvida com a fase móvel com acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água na proporção de volume (100: 11: 11: 27) em câmara previamente saturada por 20 min e em seguida a placa foi seca. Posteriormente, a placa foi removida da câmara. Após 10 min a placa foi derivatizada com 1,25 mL de solução de substrato L-DOPA e

1,5 mL de solução de enzima tirosinase com atividade 400 U/mL usando um instrumento de pulverização. A placa pulverizada foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente dentro do derivatizador e a documentação foi feita sob luz branca.

3.4.1.7 Impressão digital da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* e ensaio de inibição da enzima tirosinase

As amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidas em extrato metanólico em triplicata (10 µL) e as soluções de flavonoides de referência contendo 7 bandas foram aplicadas em placas de HPLTC 10 x 10 cm com bandas de 5,0 mm e aplicadas a uma distância de 8 mm da borda inferior da placa e 18 mm das bordas esquerda e direita com uma distância entre as bandas de 10,6 mm. Após a aplicação todo procedimento foi o mesmo descrito em 3.2.6. Outra placa usando essas mesmas amostras em triplicata (10 µL), soluções de referência de flavonoides e controle positivo foi obtida para o ensaio de inibição da enzima tirosinase contendo 9 bandas as quais foram aplicadas em placas de HPLTC 10 x 10 cm como bandas de 5,0 mm e aplicadas a uma distância de 10 mm a partir da borda inferior da placa e 20 mm das bordas esquerda e direita. A distância entre as bandas foi de 7,5 mm. Esta placa foi feita da mesma maneira descrita em 3.4.1.7.

3.4.1.8 Análise de extratos de solventes NADES com 10 % de água e metanol

Os extratos dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidos com os seis solventes NADES com 10 % de água e metanol (10 µL) em triplicata contendo 21 bandas em placa HPTLC de 20 x 10 cm foram aplicados em bandas de 5 mm e aplicados a uma distância de 10 mm borda inferior da placa e 18 mm das bordas esquerda e direita com distância entre bandas de 8,2 mm. Os cromatogramas de HPTLC foram convertidos em uma matriz de dados numéricos usando o software rTLC. Este software integra as imagens do HPTLC dimensionalmente. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o software SIMCA-P. Uma outra placa HPTLC de 10 x 10 cm com estas amostras

contendo 7 bandas foi aplicada em bandas de 5,0 mm e aplicadas a uma distância de 10,00 mm da borda inferior da placa e 20,00 mm da esquerda e da borda direita com distância entre bandas de 10,00 mm . Estas duas placas foram desenvolvidas e derivadas como explicado em 3.2.6 com o reagente 2-aminoetil-difenilborato . A última placa com NADES 10% (v/v) de água e metanol (10 µL) e com os controles positivos contendo 9 bandas em placas HPTLC de 10 x 10 cm em bandas de 5,0 mm e foram aplicadas a uma distância de 10 mm do borda inferior da placa e 20 mm das bordas esquerda e direita com distância entre as bandas de 7,5 mm para realizar o ensaio de inibição da enzima tirosinase conforme explicado na seção 3.4.1.7.

3.4.1.9 Análise do Solvente Eutéticos Natural Profundo (NADES) 6 com diferentes teores de água e ensaio de inibição da enzima tirosinase

Os extratos dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* obtidos com o solvente NADES 6 com diferentes teores de água (0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 %) e extrato com metanol (10 µL) foram aplicados em triplicata contendo 18 bandas em placas de HPTLC de 20 x 10 cm onde as bandas tinham 5 mms e foram aplicadas a uma distância de 10 mm da borda inferior da placa e 18 mm das bordas esquerda e direita com a distância entre as bandas de 9,6 mm. As condições do HPTLC para posterior análise de PCA foram semelhantes como descrito no item 3.4.1.9. Na segunda placa de HPLTC de 10 x 10 cm com estas mesmas amostras, agora com 6 bandas foram aplicadas na forma de bandas de 6,0 mm e a uma distância de 10,00 mm da borda inferior da placa e 20,00 mm das bordas esquerda e direita com distância entre as bandas 12,0 mm. Em seguida essa placa foi derivatizada com 2 mL do reagente 2-aminodifenilborato. A terceira placa foi feita para realizar o ensaio de inibição da enzima tirosinase com o solvente NADES 6 com 0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 % (v/v) de água (20 µL), extratos com o solvente metanol (10 µL) e controles positivos ácido L-ascórbico e benzoico (20 µL) contendo 8 bandas em placa de HPTLC de 10 x 10 cm foram aplicados como bandas de 5,0 mm a uma distância de 10 mm da borda inferior da placa e 20 mm das bordas esquerda e direita com distância entre as bandas de 7,5 mm.

3.4.1.10 Isolamento da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* por cromatografia líquida preparativa

Foi pesado 300 mg do medicamento fitoterápico de *Passiflora* P2 e em seguida com uma pipeta automática foi adicionado 2 mL de metanol em um tubo eppendorf. O mesmo procedimento foi repetido para outros nove tubos eppendorf diferentes.

Posteriormente os tubos eppendorf com a massa da amostra do medicamento pesada e com o solvente foi levada para o vortex por 10 min, em seguida para o ultrassom por mais 10 min e posteriormente para a centrifugada por mais 10 min. Os sobrenadantes dos tubos eppendorf da primeira extração foi transferido com uma pipeta volumétrica para seis tubos de ensaio de vidro (16 mm x 160 mm) sem tampa (fig. 7a). Em seguida com uma pipeta automática foi adicionado 2 mL de metanol a cada tubo eppendorf e repetiu-se o procedimento de extração mais uma vez. E o sobrenadante da segunda extração foi retirado transferido com uma pipeta volumétrica para um tubo de ensaio de vidro (16 mm x 160 mm) sem tampa. Uma terceira etapa de extração foi realizada. Os sobrenadantes das três extrações sucessivas foram unidos em 6 tubos de ensaio de vidro sem tampa e em seguida foram levados para uma centrífuga a vácuo (LABCONCO) para a evaporação do metanol. Posteriormente 500 uL de clorofórmio e 300 uL de água foram adicionados aos seis tubos de ensaio de vidro com todos os três extratos concentrados e foi para o vortex por 10 min e posteriormente para a centrífuga por mais 5 min. Em seguida as fases clorofórmica e aquosa foram separadas, a fase aquosa foi retirada com o auxílio da pipeta volumétrica e colocada em 6 tubos eppendorf rotulados com o código da fase aquosa (AQ) e a fase clorofórmica foi retirada também com o auxílio de uma pipeta volumétrica e colocada em outros 6 tubos eppendorf diferentes rotulados com o código da fase clorofórmica (C) conforme representado no esquema da figura 7c. A cada um dos seis tubos eppendorf com as fases clorofórmicas foram adicionados mais 100 uL de água com uma pipeta automática e depois estes eppendorf foram para o vortex e em seguida para a centrífuga repetindo-se então a etapa da extração. Então, nesses tubos formou-se uma dupla camada com uma fase clorofórmica e aquosa. Essa fase aquosa foi então retirada com uma pipeta automática e foi

colocada nos tubos eppendorf rotulados com a fase aquosa obtida inicialmente e. Todo o procedimento está representado nos esquemas das figuras 9a, 9b e 9c.

Figura 9(a) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.

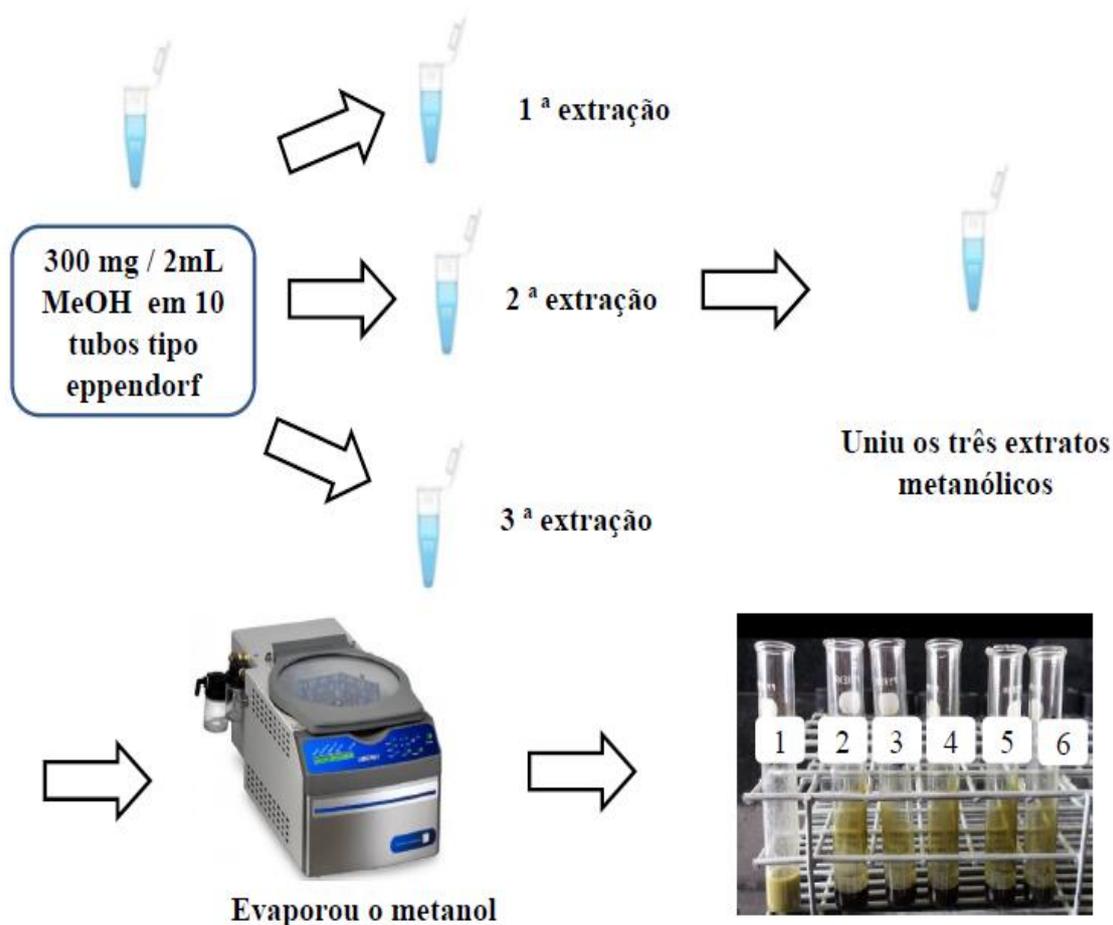


Figura 9(b) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.

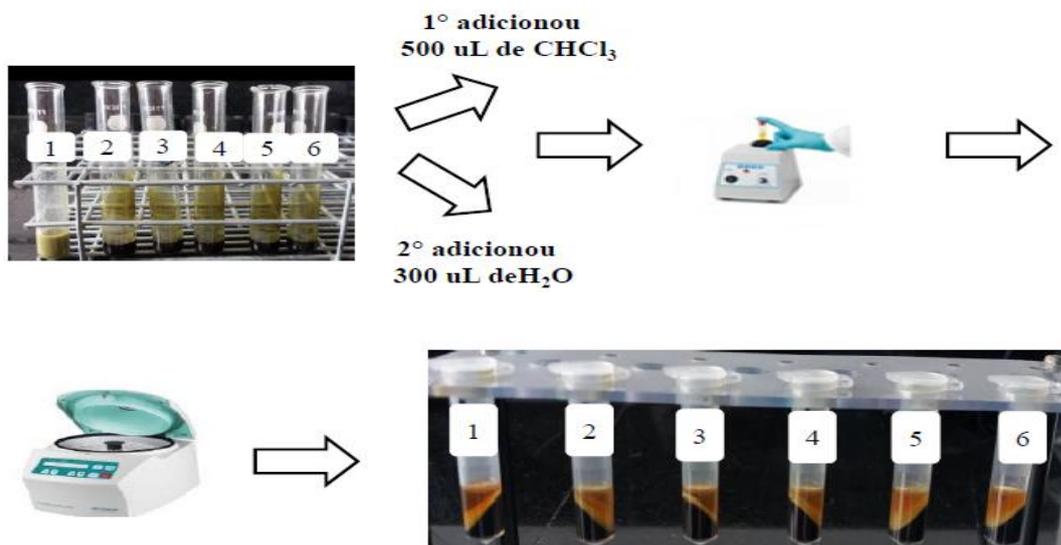
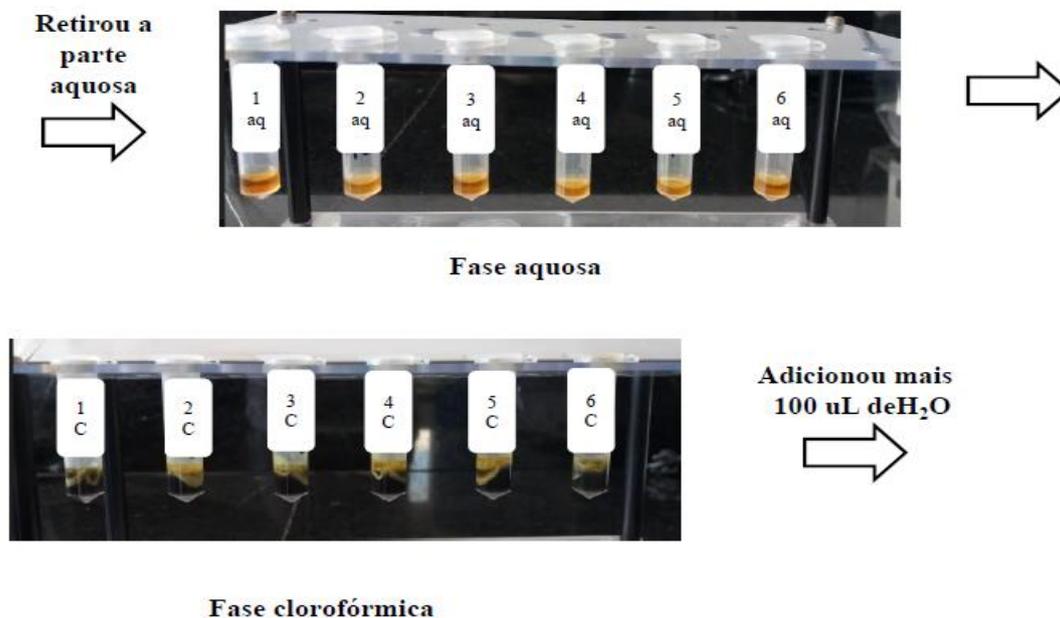


Figura 9(c) – Esquema do protocolo de concentração da amostra do medicamento fitoterápico P2 para isolamento dos compostos por HPLC.



Repetiu-se todo o procedimento de extração novamente e retirou a fase aquosa e misturou com a fase aquosa da 1ª extração

Depois a fase aquosa que estava dividida nos seis tubos eppendorf foi unida e pesada em uma balança e a massa obtida foi de 75 mg, em seguida 600 uL de água foram adicionados com uma pipeta automática. Em seguida uma alíquota de 100 uL desta solução aquosa foi transferida com uma pipeta automática para outro tubo vial e 400 uL de água foram acrescentados. Para a análise de HPLC foram injetados 40 uL desta solução. Sucessivas injeções da fase aquosa foram realizadas a fim de separar os diferentes compostos presentes na fase aquosa. As condições da corrida cromatográfica foram as mesmas que estão descritas no item 2.3.1 no capítulo 2.

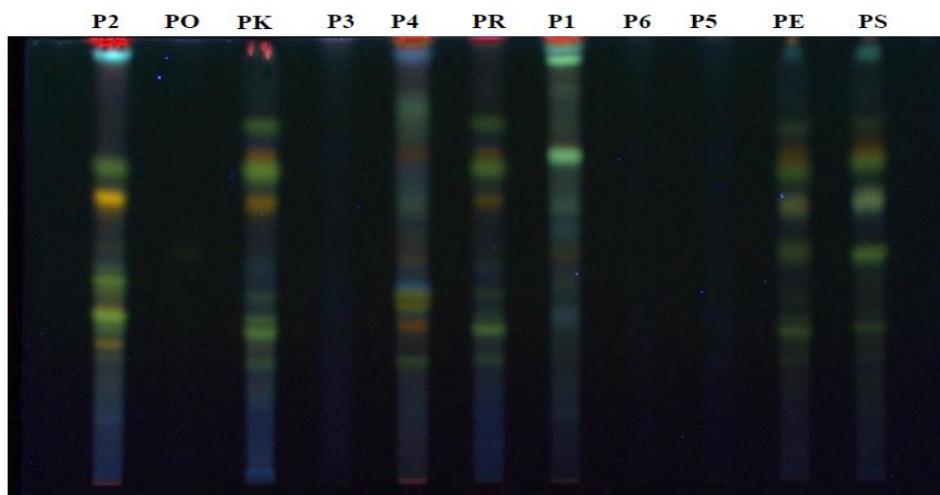
Assim, cada pico referente a um dos compostos presentes no extrato aquoso da amostra do medicamento de *Passiflora* P2 foi coletado em tubos eppendorf separados que foram rotulados com números para a identificação. No total 18 picos foram coletados em tubos Falcon de 50 mL e seus respectivos volumes foram registrados. . Então para a eliminação da fase móvel (água 0,2 % de ácido fórmico e acetonitrila) usada na cromatografia primeiramente os tubos Falcon foram colocados em uma capela de exaustão para evaporar o ácido fórmico. Em seguida o líquido remanescente dos tubos Falcon foram transferidos para um balão volumétrico e depois foram para um rotaevaporador para evaporar a acetonitrila. A solução resultante foi transferida para novos tubos Falcon de 15 mL que foram colocados em um liofilizador para a eliminação da água. Depois que a água foi eliminada 600 uL de DMSO-d₆ foram medidos com uma pipeta volumétrica e foi adicionado ao tubo Falcon. Este tubo foi levado ao vortex por 1 min para a completa solubilização do composto. Posteriormente uma alíquota de 500 uL desta solução foi transferido com uma pipeta volumétrica para um tubo de RMN que em seguida foi levado para a análise na RMN. As condições da aquisição dos espectros de RMN e de processamento dos mesmos estão descritas nos itens 2.3.1.1 e 2.3.1.2 no capítulo 2.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPTLC)

Neste estudo foram realizados dois passos iniciais usando as amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* extraídas com metanol. O primeiro passo foi escolher qual fase móvel seria adequada para encontrar flavonoides em diferentes medicamentos fitoterápicos de *Passiflora*. Em seguida, foram testadas quatro diferentes fases móveis, a primeira fase móvel tinha em sua composição tolueno e acetato de etila (9: 1), a segunda tinha em sua composição clorofórmio, acetato de etila, metanol e água (15: 40: 22: 10), e a terceira tinha em sua composição diclorometano, metanol e água (70:30: 4) e a quarta tinha em sua composição acetato de etila, ácido fórmico e água (100: 11: 11: 27). A última fase móvel foi escolhida porque é comumente usada para analisar flavonoides (ZERAIK et al., 2012). O segundo passo foi escolher entre as onze amostras de *Passiflora* qual delas continha mais flavonoides. Então, no perfil de impressões digitais, de todas essas onze amostras de medicamentos fitoterápicos foram obtidas (fig 10).

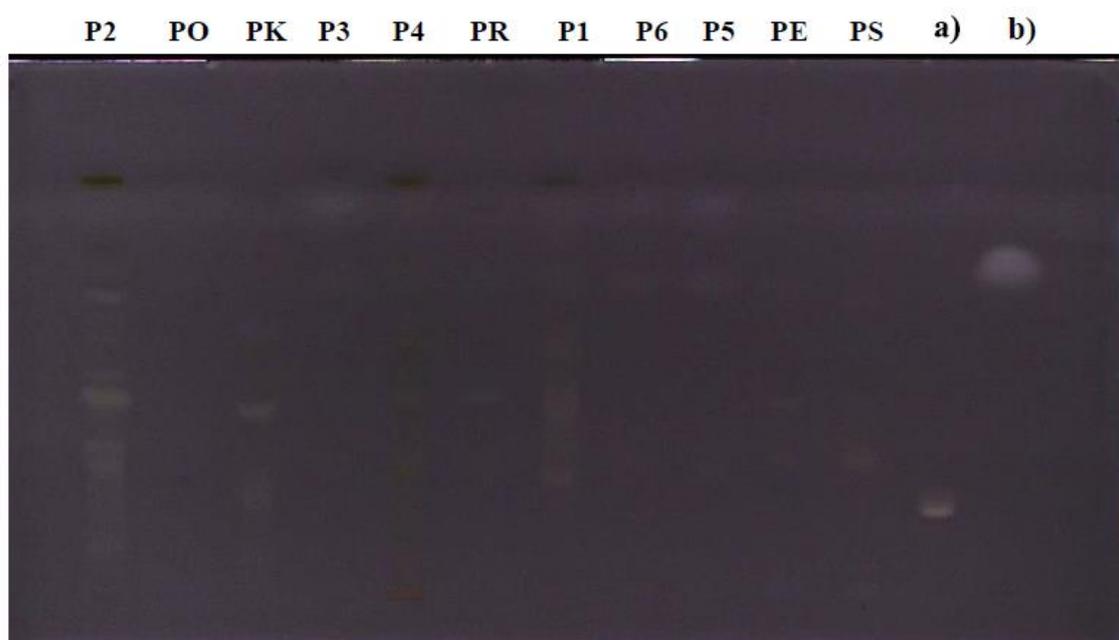
Figura 10. Impressão digital dos extratos metanólico das onze amostras de medicamentos fitoterápicos contendo *Passiflora* P2, PO, PK, P3, P4, PR, P1, P6, P5, PE e PS obtidos por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).



De acordo com o cromatograma mostrado na figura 10 foi possível observar diferentes impressões digitais para cada uma dessas onze amostras de medicamentos fitoterápicos de *Passiflora*. Os medicamentos PO, P3, P6 e P5, não apresentaram nenhum flavonoide. No entanto, o medicamento P2 mostrou mais flavonoides que podem ser notados pelas cores amarelas e verdes na primeira mancha características da presença destes compostos quando se usa o reagente 2-aminodifenilborato para a sua identificação em cromatografia de camada delgada (et al., 2014).

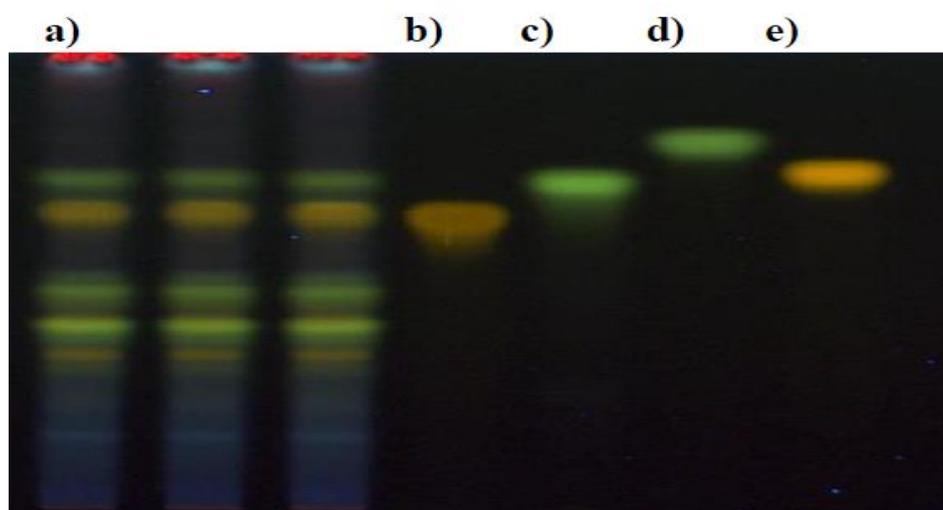
Em seguida, foi realizado o ensaio de inibição da enzima tirosinase para verificar se as amostras dos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* possuíam compostos inibidores os quais podem ser identificados como manchas brancas na placa de HPTLC. As amostras dos medicamentos fitoterápicos P2 tinha cinco compostos inibidores da enzima tirosinase e os medicamentos PK, P3, P4, PR, PE e PS, tinham um composto inibidor da enzima tirosinase, enquanto os medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* PO, P6 e P5, não tinham nenhum composto inibidor da tirosinase (fig. 11).

Figura 11 - Ensaio de inibição autobiográfico da enzima tirosinase usando placas de HPTLC e as amostras dos medicamentos dos fitoterápicos contendo **Passiflora** P2, PO, PK, P3, P4, PR, P1, P6, P5, PE e PS e dos compostos em a) ácido benzoico e b) ácido L-ascórbico.



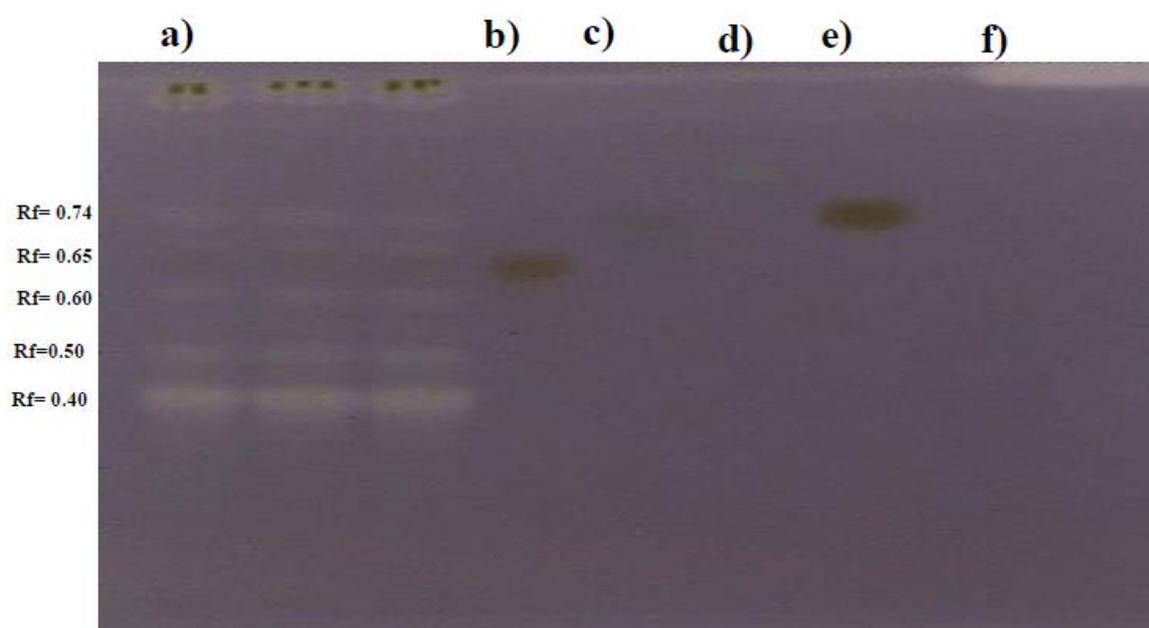
Este ensaio de inibição da enzima tirosinase foi realizado seguindo o protocolo CAMAG para inibição de tirosinase utilizando material vegetal e placas de HPTLC. Essa reação ocorreu entre a enzima e o substrato L-DOPA por um período de tempo específico na placa de HPTLC e foi possível distinguir entre compostos inibidores e ativadores da enzima de maneira visual. Este método é melhor que o método espectroscópico, pois permite obter informações dos compostos Inibidores ou e ativadores da enzima, ao contrário do que acontece quando o ensaio é realizado com os métodos espectroscópicos onde a informação obtida é a respeito do extrato da planta e não do composto individual (WANGTHONG et al., 2007 e TAIBON et al., 2015). Então a amostra do medicamento fitoterápico P2 foi selecionada para ser testada com os padrões de flavonoides para avaliar qual a espécie de *Passiflora* estava presente no medicamento fitoterápico. A avaliação foi realizada em extrato metanólico, pois é um extrato rápido de ser obtido. Então, este medicamento foi analisado com quatro flavonoides C-glicosídeos característicos das espécies de *Passiflora* isoorientina, isovitexina, vitexina e orientina. Comparando os valores de R_f e as cores das bandas do medicamento com os padrões, foram identificados isoorientina ($R_f = 0,73$, banda amarelo) e isovitexina ($R_f = 0,80$, banda verde) presentes na região superior da placa com valores mais altos de R_f (fig. 12).

Figura 12 – Impressão digital dos a) extratos metanólicos em triplicata da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 e padrões de flavonoides b) isoorientina, c) isovitexina, d) vitexina e e) orientina por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).



A presença destes flavonoides C-glicosídeos é característica de *P. incarnata* segundo Wosch et al. (2017) que estudou com base na análise HPTLC. Para tentar identificar um destes compostos como inibidor da enzima tirosinase realizou-se o ensaio de inibição da tirosinase e, de acordo com o cromatograma da figura 13 foi observado a cor marrom para os compostos isoorientina e orientina porque as moléculas de enzima ainda ativas entram em contato com a L-tirosina que será catalisada e formaram produtos marrons na placa de HPTLC (WANGTHONG et al., 2006). Logo, estes dois compostos são ativadores da enzima tirosinase. Foram identificados também cinco compostos inibidores da enzima de acordo com os seus respectivos valores de R_f , 0,40, 0,50, 0,60, 0,65 e 0,70.

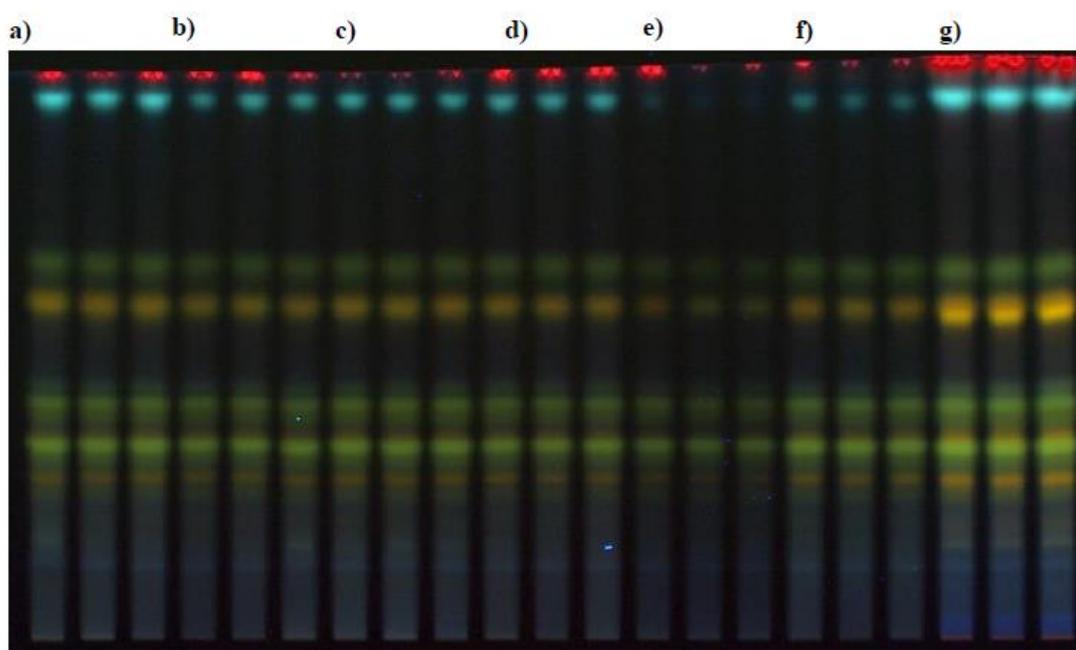
Figura 13 - Ensaio de inibição autobiográfico da enzima tirosinase usando placas de HPTLC obtido com extrato metanólico em triplicata da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 e os padrões de flavonoides b) isoorientina, c) isovitexina, d) vitexina e e) orientina.



Uma vez que possivelmente a identidade da amostra do medicamento fitoterápico de *Passiflora* P2, o próximo passo foi extrair os compostos presentes neste com metanol e com seis solventes NADES (figura 14) de diferentes classes, por exemplo, ácidos e base, ácidos e neutro, bases e neutro,

aminoácidos e ácidos, apenas compostos neutros e neutros e aminoácido. No entanto, o extrato do solvente NADES é difícil de trabalhar, porque é necessário removê-los dos compostos extraídos. Assim, uma etapa de separação foi necessária através da extração em fase sólida (SPE) (item 3.4.1.2). Foi possível obter a impressão digital dos compostos extraídos pelos solventes NADES porque a combinação entre a composição do NADES e o HPTLC, utilizando reagente adequado para derivatização, permite o estudo de compostos alvo. O HPTLC foi escolhido também porque é possível fazer comparações lado a lado para muitas placas ao mesmo tempo (TAIBON et al., 2015).

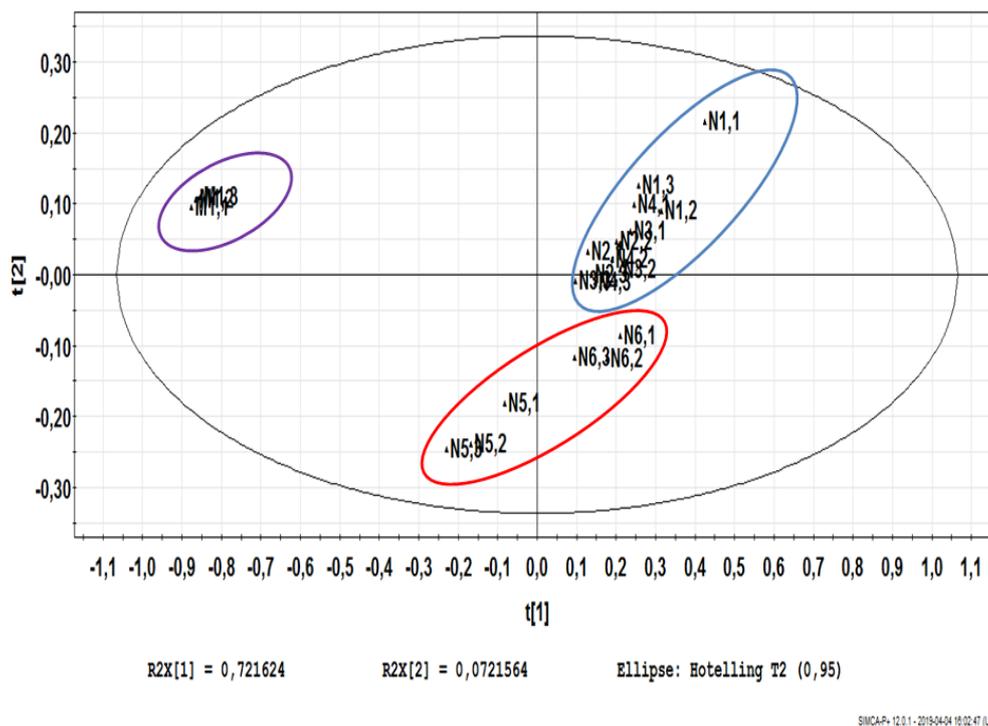
Figura 14 – Impressão digital de cada um dos seis extratos NADES em a) NADES 1, b) NADES 2, c) NADES 3, d) NADES 4, e) NADES 5, f) NADES 6 e g) extrato metanólico obtidos em triplicada com da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 por HPTLC.



Estes solventes NADES foram testados para extrair flavonoides, pois eles puderam fazer ligações de hidrogênio entre flavonoides e NADES devido à presença de grupos funcionais hidroxila (-OH), carbonila (-COOH) e amina (-NH₂) presentes no NADES e hidroxila (-OH) presente nos flavonoides (DAI et al., 2013 e ESPINO et al., 2016). Com o cromatograma da figura 14 foi possível ver que todos os seis NADES testados revelaram que, com exceção do NADES 3 e

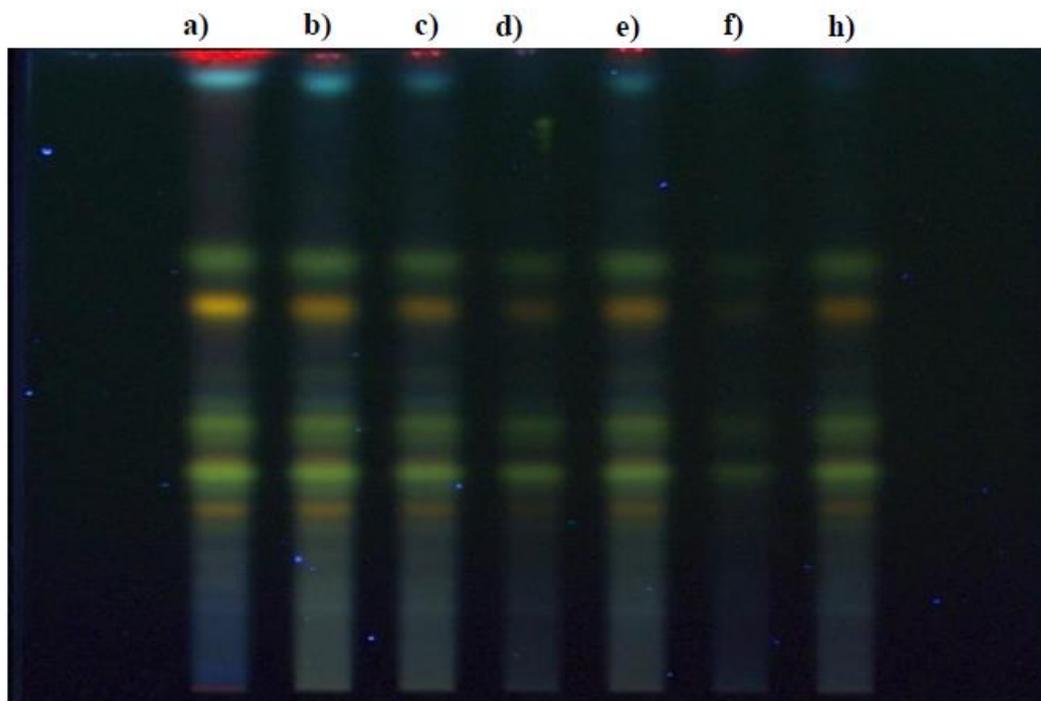
5, efetivamente extraíam menos flavonoides com base na intensidade das manchas. Para obter uma classificação sobre o perfil da extração foi feito o PCA (figura 15) com os dados obtido do escaneamento da placa de HPTLC dos extratos NADES em triplicata.

Figura 15 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos NADES 1,2,3,4,5 e 6 e do extrato metanólico.



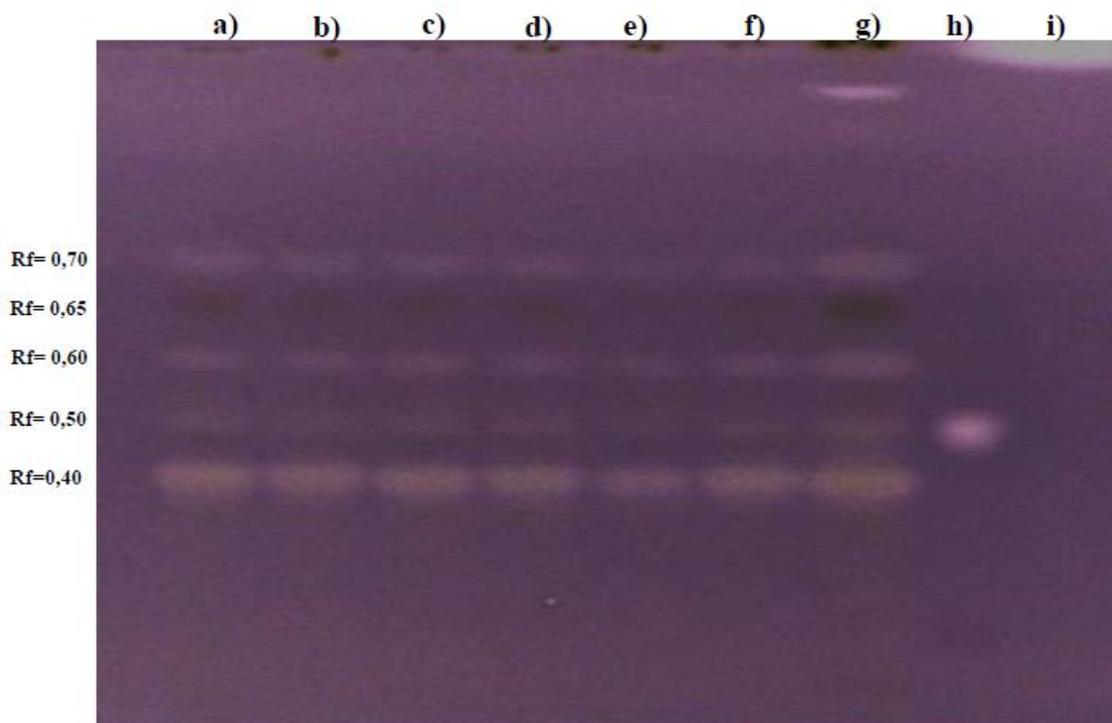
No gráfico de PCA, todos os extratos dos solventes NADES foram claramente discriminados em relação ao extrato de metanólico. O primeiro agrupamento consistiu dos extratos de metanólicos (grupo selecionado com a elipse violeta), o segundo dos extratos dos solventes NADES 1, 2, 3, 4 (grupo selecionado com a elipse azul) e o terceiro dos solventes NADES 5 e 6 (grupo selecionado com a elipse vermelha), implicando uma similaridade em seus perfis químicos. Ao longo do eixo PC1, os extratos NADES 5 e 6 estavam mais próximos dos extratos de metanol do que os outros extratos de NADES. Com o cromatogramas exibidos nas figuras 14 e 16 e com os dados de PCA (figura 15) foi possível ver que o perfil de extração do metanol e dos solventes NADES, sugere que o NADES é um solvente de extração promissor pelo fato de exibir propriedades químicas similares aos extratos metanólicos.

Figura 16 – Impressão digital do a) extrato de metanólico e do extrato em b) NADES 1, c) NADES 2, d) NADES 3, e) NADES 4, f) NADES 5 e g) NADES 6 da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 usando HPTLC.



O ensaio auto de inibição da enzima tirosinase foi feito com outra placa com os mesmos extratos metanólico, NADES 1, NADES2, NADES 3, NADES 4, NADES 5 e NADES 6 (figura 16). Assim, a placa com os extratos NADES para o teste de inibição da enzima (fig. 17) mostrou que foi possível ver todos os solventes NADES selecionados foram adequados para extrair todos os compostos inibidores da enzima tirosinase como podemos ver nas manchas brancas na placa de HPTLC e um composto ativador da enzima também foi extraído como podemos ver na mancha marrom na placa (isorientina).

Figura 17 - Ensaio de inibição autobiográfico de inibição da enzima tirosinase utilizando o HPTLC dos extratos a) NADES 1, b) NADES 2, c) NADES 3, d) NADES 4, e) NADES 5, f) NADES 6 e g) do extrato de metanólico e dos padrões h) ácido benzoico e i) ácido L-ascórbico



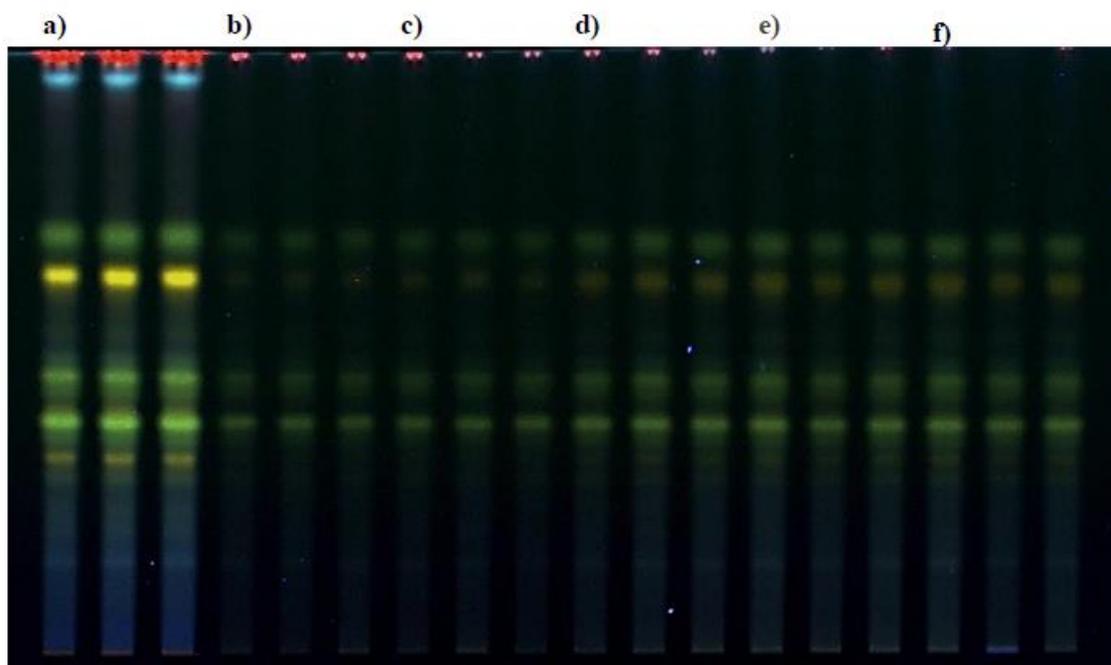
De acordo com o cromatograma da figura 17 todos os 6 extratos de solventes NADES mostraram quatro compostos inibidores da enzima tirosinase ($R_f = 0,42$, $R_f = 0,50$, $R_f = 0,60$ e $R_f = 0,70$) e um ativador ($R_f = 0,65$), mas os extratos metanólicos tiveram cinco compostos inibidores ($R_f = 0,42$, $R_f = 0,50$, $R_f = 0,60$, $R_f = 0,70$ e $R_f = 0,90$). Este quinto composto é não polar devido ao seu o maior valor R_f e sua posição no topo da placa.

Com base no ensaio de inibição da enzima tirosinase, todos os seis extratos NADES não mostraram qualquer diferença na extração dos compostos presentes na amostra contendo *Passiflora* P2. Então o solvente NADES 6 foi escolhido para realizar experimentos com diferentes teores de água, porque é menos tóxico e foi mais fácil de ser manipulado. A avaliação do teor de água foi feita porque o NADES possui alta viscosidade, então, se a água fosse adicionada, seria possível aumentar a capacidade do rendimento da extração diminuindo a viscosidade. No entanto, a porcentagem de água não podia

exceder em cinquenta por cento (DAI, et al., 2016), caso contrário à sua estrutura poderia ser modificada com a adição de água através da ruptura das ligações de hidrogênio na molécula do NADES (ESPINO et al., 2016).

Para avaliar o efeito da adição da água foram adicionados 0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 % de água ao solvente NADES 6. Cada uma das porcentagens da adição de água ao NADES foi realizado em triplicata para posterior análise multivariada de dados (AMD) (fig. 18). Foi possível ver que o NADES 6 com um teor de 10% de água foi suficiente para aumentar a capacidade de extração (figura 18).

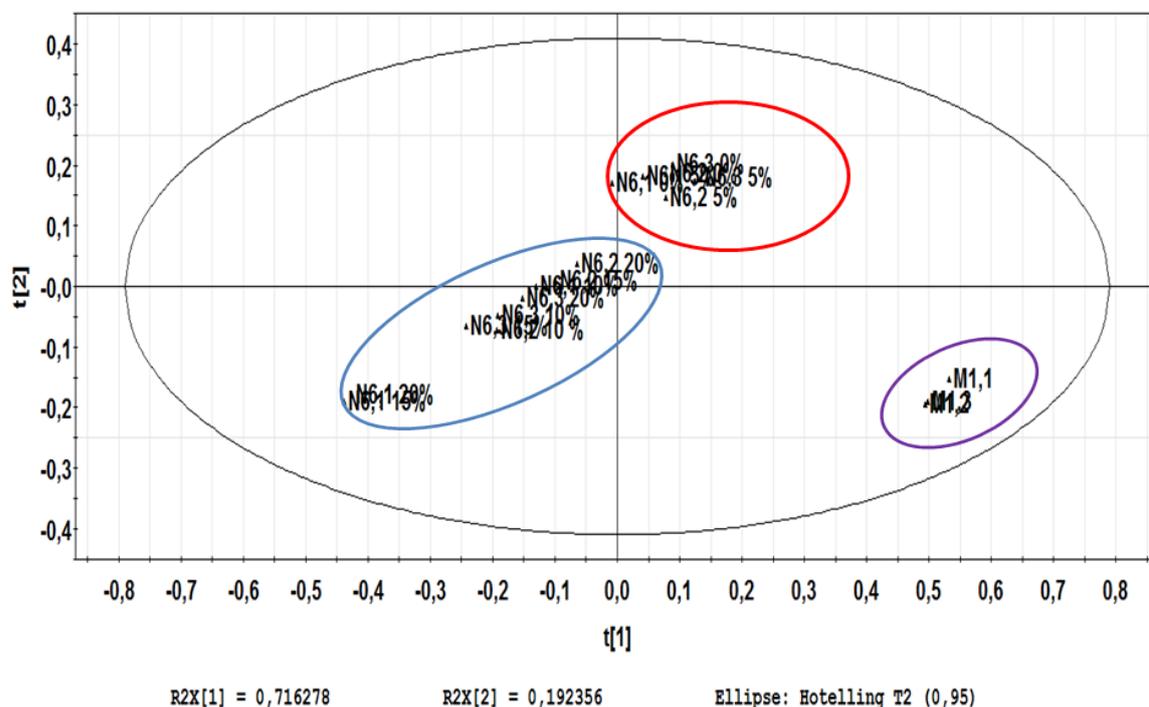
Figura 18 - Extratos a) metanólicos e com o solvente NADES 6 com diferentes concentrações de água b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e f) 20 % de água da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* usando HPLTC.



No plote de PCA representado na figura 19 os extratos NADES com diferentes quantidades de água foram claramente discriminados em relação ao extrato metanólico. O primeiro grupo consistiu de um extrato metanólico (grupo selecionado com a elipse violeta), o segundo grupo consistiu de NADES 6 com 0 % e 5 % de água (grupo selecionado com a elipse em vermelho) e o terceiro de NADES 6 com 10 %, 15 % e 20 % de água (grupo selecionado com a elipse

azul) implicado na similaridade dos perfis químicos. Ao longo do eixo PC1, NADES 6 com 10 %, 15 % e 20 % foram próximos aos extratos metanólicos do que os outros NADES (0 % e 5 %).

Figura 19 - Plote da análise dos componentes principais (PCA) dos extratos NADES 6 com diferentes quantidades de água (0 %, 5 %, 10 %, 15 % e 20 %).



SMCA-P+ 12.0.1 - 2019-04-04 16:13:43 (UTC-3)

Assim, de acordo com a divisão dos grupos de perfis químicos similares pelo PCA, verificamos que o NADES 6 com 10 % de água em sua composição tem a quantidade suficiente de água para a extração dos compostos. Dois testes foram realizados com os extratos do solvente NADES 6 com diferentes teores de água. Para isso duas placas iguais foram feitas. Em uma placa foi realizado uma corrida cromatográfica e posterior derivatização com o reagente 2-aminodifenilborato (fig 20) e a outra placa foi usada para o teste de inibição da enzima tirosinase (fig. 21).

Figura 20 - Perfil dos extratos em a) metanólico e dos extratos do NADES 6 com diferentes quantidades de água em b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e em f) 20 % de água da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* usando HPTLC.

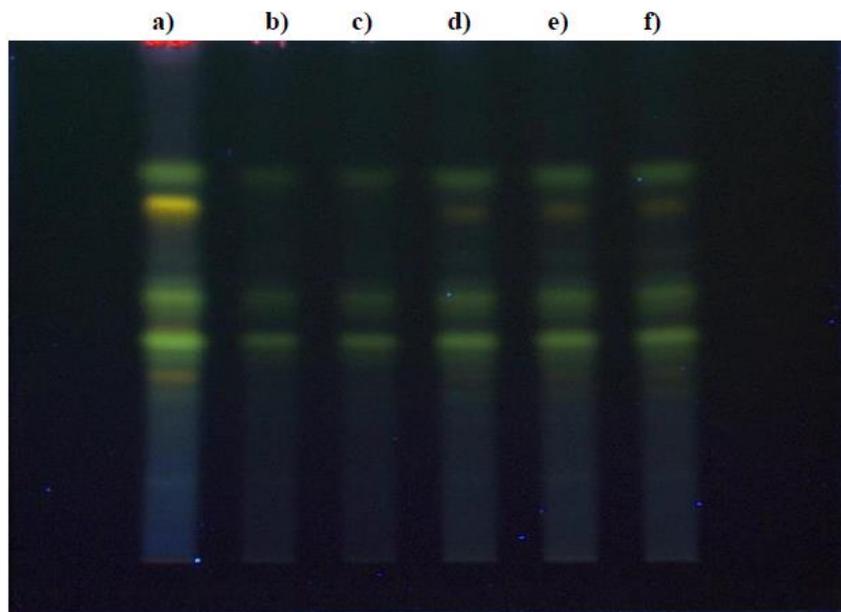
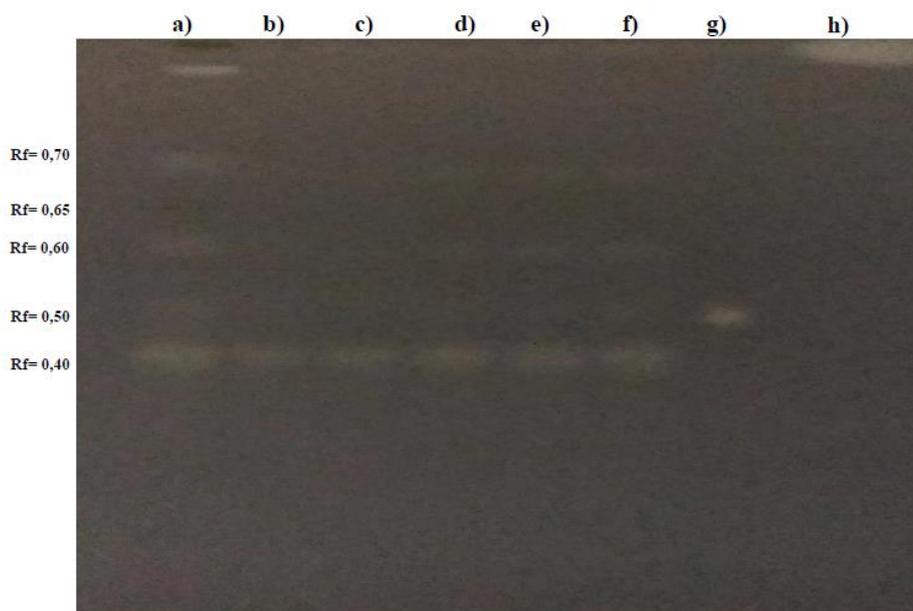


Figura 21 - Ensaio de inibição autobiográfico de inibição da enzima tirosinase utilizando o HPTLC a partir dos extratos em a) metanólico e com o NADES 6 com diferentes concentrações de água em b) 0 % de água, c) 5 % de água, d) 10 % de água, e) 15 % de água e em f) 20 % de água

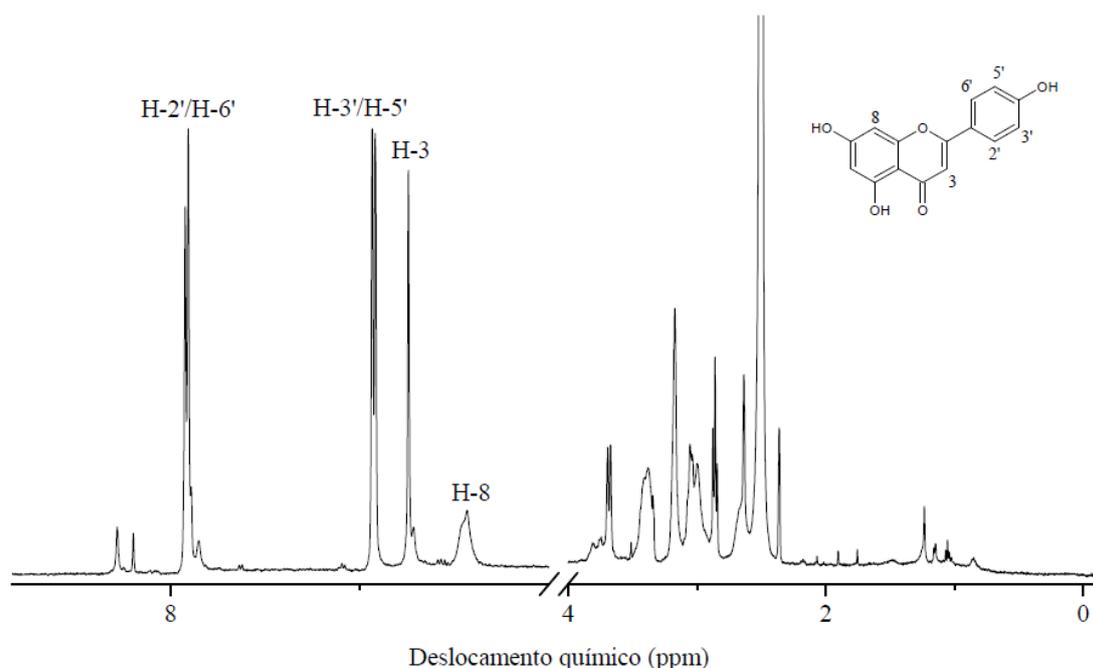


De acordo com o perfil de extração do solvente NADES 6 (figura 20) com diferentes teores de água 10 %, 15 % e 20 %, observamos que as extrações foram similares a extração do metanol, porém quando analisamos as mesmas amostras dos medicamentos depois de ter sido submetida ao ensaio de inibição da enzima tirosinase (fig. 21) o teor de água não influenciou na extração de todos os quatro compostos inibidores da enzima.

3.5.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL (RMN – 2D)

O composto com maior atividade de inibição da enzima tirosinase foi isolado da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 através da cromatografia líquida preparativa (conforme descrito no item 3.4.1.11). Primeiramente foi obtido o espectro de e RMN- ^1H , os sinais de (fig. 22) H-2'/H-6', H-3'/H-5', H-3 e H-8 foram observados e identificados como do esqueleto do flavonoide. Estes sinais já haviam sido determinados na amostra deste medicamento conforme os dados apresentados no item 2.4.1 no capítulo 2.

Figura 22 –Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) do composto isolado do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2 em DMSO- d_6 .



Depois da aquisição do espectro de RMN-¹H conclui-se que o composto inibidor da enzima era um derivado da isovitexina (devido a sua posição na placa de HPTLC) e foi necessário fazer a espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN-2D) para determinar o esqueleto completo da molécula, pois só com RMN-2D seria possível determinar a posição dos açúcares da aglicona, ou seja, o tipo de ligação glicosídica, assim como o número de açúcares ligados ao flavonoide previamente identificado no espectro de hidrogênio (ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2014 e VILLIERS et al., 2016).

De acordo com a análise do espectro de RMN-2D de correlação heteronuclear múltiplo (HMBC) (figura 23) foram identificados sinais de hidrogênios de um flavonoide conforme assinalado no espectro e atribuído na tabela 4. Este flavonoide corresponde a um derivado da isovitexina. Este derivado da isovitexina é do tipo C-glicosídeo, ou seja, o primeiro açúcar ligado ao esqueleto do flavonoide é através de uma ligação carbono do flavonoide com carbono do açúcar. Como o flavonoide é um derivado da isovitexina a única possibilidade desta ligação só poderia ocorrer nas posições 6 ou 8, neste composto ocorreu na posição 6 conforme observamos no espectro de HMBC pelo sinal anomérico do açúcar (H-1"/C-6). Este tipo de ligação é considerado muito resistente (VILLIERS, 2016). A investigação dos sinais no espectro de HMBC foi realizada através da comparação com os dados da literatura (ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2014) e através do conhecimento prévio de que flavonoides do tipo glicosídeo já haviam sido relatados como composto inibidor da enzima tirosinase encontrado na *P.edulis* (ZHANG et al., 2013).

Figura 23 – Espectro de ressonância magnética heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do flavonoide inibidor da tirosinase isolado do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2.

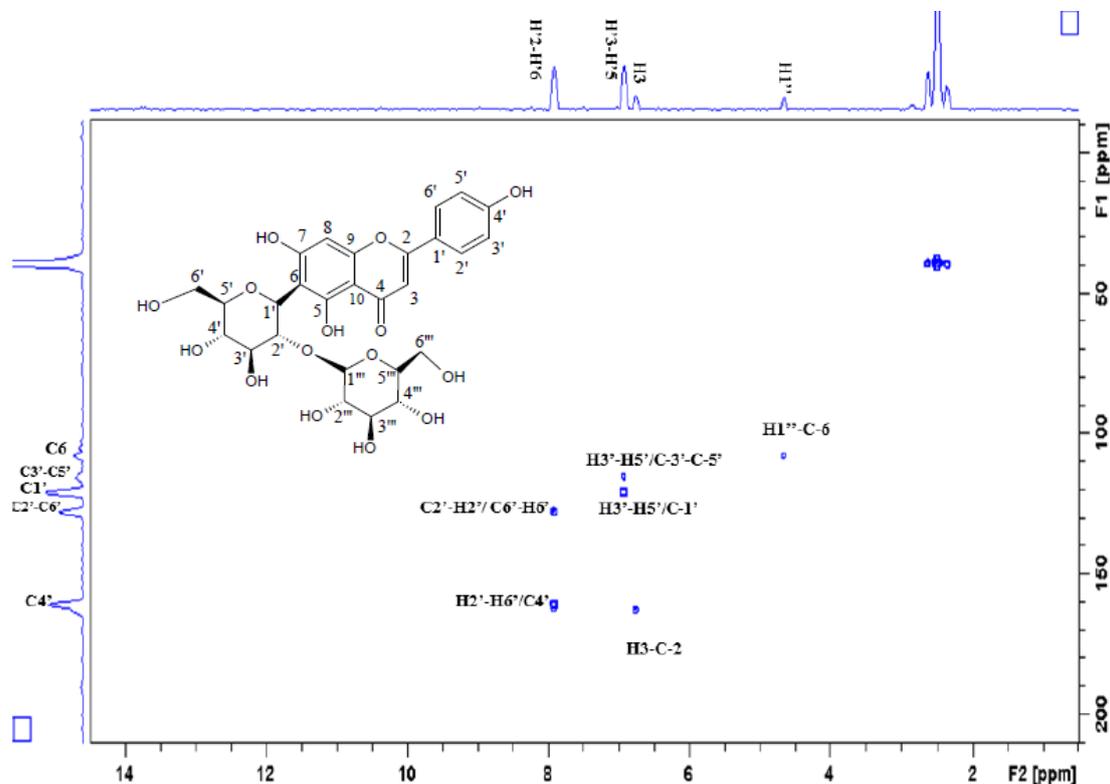


Tabela 4 - Dados de HMBC do flavonoide inibidor da tirosinase isolado do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2.

$\delta^1\text{H}$	Atribuição	$\delta^{13}\text{C}$	Atribuição	$\delta^{13}\text{C}$	Atribuição
7,92	H-2'/H-6'	1280	C-6'	161	C-4'
6,94	H-3'/H-5'	1212	C-1'	115	C-3'/C-5'
6,76	H-3	1632	C-2	-	-
4,66	H-1''	1088	C-6	-	-

No entanto, para a elucidação completa da molécula foi obtido o espectro de correlação heteronuclear (HSQC) (fig. 24). De acordo com o espectro de

HSQC do flavonoide inibidor da tirosinase i observamos a correlação dos sinais dos hidrogênios e carbonos assinalados no espectro da figura 24 e na tabela 5. Com o espectro de HSQC foi possível observar os sinais dos dois açúcares presentes no derivado da isovitexina. Os sinais do segundo açúcar foram observados e o sinal do segundo hidrogênio anomérico H-1''' com o carbono C-1''' foi identificada. Logo, o derivado da isovitexina é do tipo C-glicosídeo-O-glicosídeo (ZHANG et al., 2013). De acordo com a comparação dos dados do espectro de HSQC obtido com os dados da literatura o identificamos com isovitexina-2''-O-β-D-glicosídeo. Os dois açúcares presentes neste composto foram a molécula de glicose.

Figura 24 – Espectro de ressonância magnética heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) do composto inibidor da tirosinase isolado da amostra do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora* P2.

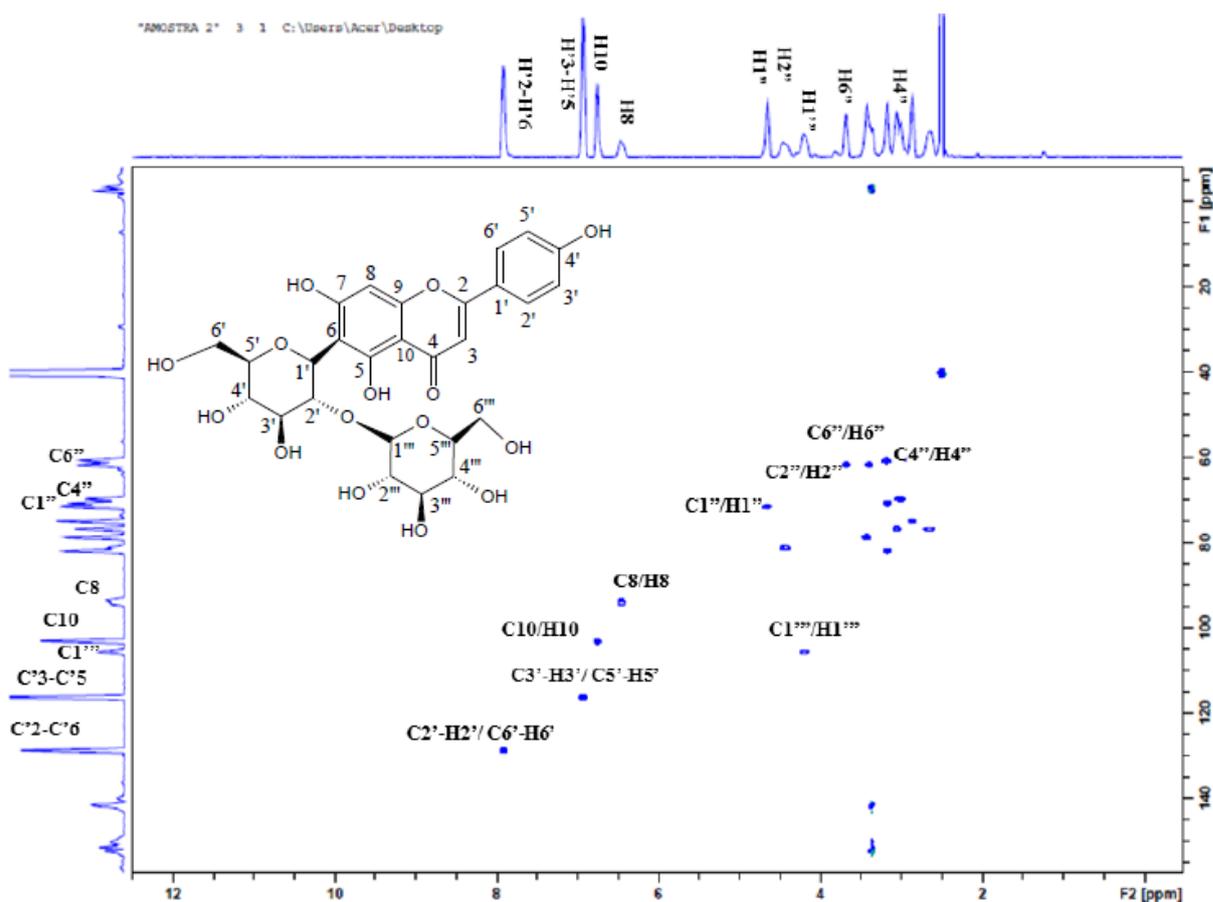


Tabela 5- Deslocamentos químicos de carbono do composto inibidor da enzima tirosinase em comparação com os valores de deslocamento químicos relatados na literatura (AGRAWAL, 1989).

$\delta^{13}\text{C}$	Atribuição	$\delta^{13}\text{C}$
Flavonoide de Referência		Flavonoide do medicamento
121,0	C-1'	-
128,2	C-2'	128,9
115,6	C-3'	116,43
161,0	C-4'	-
115,6	C-5'	116,43
128,2	C-6'	128,9
163,3	C-2	-
102,8	C-3	105,76
181,7	C-4	-
161,0	C-5	-
108,6	C-6	108,8
163,3	C-7	-
93,3	C-8	94,00
152,2	C-9	-
103,2	C-10	-
70,7	C-1''	70,9

Tabela 5 – completa.

$\delta^{13}\text{C}$	Atribuição	$\delta^{13}\text{C}$
Flavonoide de Referência		Flavonoide do medicamento
70,7	C-1''	70,9
80,3	C-2''	80,58
78,2	C-3''	78,1
70,3	C-4''	70,1
81,0	C-5''	81,36
61,3	C-6''	61,1
104,6	C-1'''	105,1
74,3	C-2'''	74,3
76,1	C-3'''	76,2
69,6	C-4'''	69,1
75,9	C-5'''	76,1
60,5	C-6'''	60,1

O flavonoide isovitexina-2''-O- β -D-glicosídeo identificado de acordo com os espectros de HMBC e HSQC foi capaz de inibir a enzima tirosinase, pois esta enzima possui um centro catalítico de cobre onde o flavonoide pode interagir e também porque a enzima pode ligar-se as hidroxilas presentes nos anéis A e B que estão presentes nos flavonoides (KIM et al., 2016). Este é o primeiro estudo onde o inibidor da tirosinase isovitexina-2''-O- β -D-glicosídeo é relatado e em que ele foi extraído da espécie *Passiflora Incarnata*. Outros flavonoides inibidores da

enzima, assim como a vitexina e a isovitexina já haviam sido relatados na literatura como compostos inibidores da enzima (YAO et al., 2012, JEONG et al., 2016, ORHAN et al., 2015, e ZUO et al., 2019), assim como outros compostos como flavonóis, calconas, alcaloides e esteroides (ZOLGHADRI et al., 2019).

3.6 CONCLUSÕES

Em nossos estudos foram avaliados o perfil de extração dos flavonoides presentes nos medicamentos fitoterápicos de *Passiflora* por seis solventes NADES e pelo solvente metanol a fim de comparar a extração de ambos. De acordo com as análises de PCA dois grupos de compostos de extração de composição química similar foram encontrados, grupo 1 que compõe os solventes NADES 1, 2, 3 e 4 e o grupo 2 que compõe os solventes NADES 5 e 6. Este segundo grupo apresentou perfil de extração dos compostos mais similar ao solvente metanol.

Mas, apesar da divisão dos solventes NADES em grupos no PCA, todos eles extraíram os compostos inibidores da enzima tirosinase dos medicamentos P2, PK, P3, P4, PR e PE. Assim, como todos os NADES extraíram os inibidores da tirosinase o solvente NADES 6 foi selecionado para adição de água em sua composição a fim de aumentar a capacidade de extração dos flavonoides inibidores da tirosinase da amostra do medicamento fitoterápico de *Passiflora* P2, pois ele apresentou um maior número destes compostos.

O solvente NADES 6 com 10 % de água apresentou uma quantidade suficiente de água para aumentar a capacidade de extração. O flavonoide com maior atividade de inibição da enzima foi isolado e elucidado através da RMN como isovitexina-2"-O- β -D-glicosídeo. Este é o primeiro relato deste composto na literatura como inibidor da enzima tirosinase extraído do medicamento fitoterápico contendo *Passiflora*.

3.7 REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.K.; Carbon-¹³ NMR of flavonoids, V.39, Amsterdam: Elsevier 1989

BANDYUKOVA, V.A.; ZEMTSOVA, G.N.; *Use of sephadex in the analysis of some flavonoids*, Khimija Prirodnikh Soedinu, 1970, 6:415-417.

BANKS, W.R.; CLORE, L.S. DADEY, E.J.; DIGENIS, G.A. *Tritiated and deuterated alprazolam. The use of deuterium NMR to study Isotope exchange in tritiated alprazolam*, **Appl. Radiat**, 1993, Vol. 44, N°7, 101-1027.

ANDOLA, H.C.; PUROHIT, V.K.; *High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical tool for Biological Analysis*, **Nature and Science**, vol 8, 2010: 58-61.

BLIGH, S.W.A.; WANG, Z.H.; PARMAR, S.; EYOB, S.; OGEGBO, O.L.; *Metabolomics of four TCM herbal products: application of HPTLC analysis*, **Analytical Methods**, 2012, 4: 2522-2527.

BRAM, S.; WOLFRAM, E.; *Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography*, **Phytochemical Analysis**, vol. 28, p. 74-86, 2016.

BOUKLOUZE, A.; KHARBACH, M.; CHERRAH, Y.; HEYDEN, Y.V.; *Azithromycin assay in drug formulations: Validation of a HPTLC method with a quadratic polynomial calibration model using the accuracy profile approach*, **Annales Pharmaceutiques Françaises**, 2017, 75: 112-120.

CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H.; *Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de Maytenus (Celastraceae) e de Passiflora (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2009, 19:860-864.

CABRERA, C.G.; WAISBAUM, R.G.; NUDELMAN, N.S.; *Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis and photodegradation of diazepam and alprazolam*, **Journal of physical organic chemistry**, 2005, 18, 156-161.

CHANG, T.S.; *An updated review of tyrosinase inhibitors*, **International Journal of Molecular Sciences**, 10, 2009:2440-2475.

CIESLA, L.M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; WOJTUNIK, K.A.; HAJNOS, M.; *Thin-Layer Chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads*, **Photochemistry Letters**, vol. 11, p.445-454, 2015.

CHENG, Z.; WU, T.; *TLC Bioautographic: High Throughput Technique for Screening of Bioactive Natural Products*, **Combinatorial Chemistry e High Throughput Screening**, vol. 16, p. 531-549, 2013.

CHOI, Y.H.; SPRONSEN, J.V.; DAI, Y.; VERBERNE, M.; HOLLMANN, F.; ARENDS, I.W.C.E.; WITKAMP, G.J.; VERPOORTE, R.; *Are Natural deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?*, **Plant Physiology**, 2011, 156: 1701-1705.

CHENG, Z.; WU, T.; *TLC Bioautographic: High Throughput Technique for Screening of Bioactive Natural Products*, **Combinatorial Chemistry e High Throughput Screening**, vol. 16, p. 531-549, 2013.

COLLINS, C.H.; *O aperfeiçoamento da cromatografia em camada delgada*, **Scientia Chromatographica**, 2010, 2: 5-9.

DAI, Y.; SPRONSEN, J.V.; WITKAMP, G.J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; *Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology*, **Analytica Chimia Acta**, 2013, 766: 61-68.

DAI, Y.; WITKAMP, G.J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; *Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications*, **Food Chemistry**, 2015, 187: 14-19.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; *Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*)*, **Food chemistry**, 2014, 159: 116-121.

DAI, Y.; ROZEMA, E.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; *Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents*, **Journal of Chromatography A**, 2016, xxx: xxx-xxx.

DHAWAN, K. DHAWAN, S.; SHARMA, A.; *Passiflora: a review update*, **Journal of Ethnopharmacology**, 2004, 94: 1-23.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C.; *Cromatografia um breve ensaio, Química Nova na Escola*, v.7, p.21-25, 1998.

ESPINO, M.; FERNÁNDEZ, M.A.; GOMEZ, F.J.V.; SILVA, M.F.; *Natural designer solvents for greening analytical chemistry, Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 76: 126-136.

FARAG, M.A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C.G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L.A.; *Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus Passiflora Leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools, Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 3125-3143.

GADAPE, H.H.; PARIKH, K.S.; *Quantitative determination and validation of metformin hydrochloride in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy, E-Journal of chemistry*, 2011, 8(2), 767-781.

HEYDEN, Y.V.; SMEYERS-VERBEKE, J.; DEJAEGHER, B.; RISHA, P.G.; SIGONDA, M.N.; UGULLUM, C.; KAALE, E.; SHEWIYO, D.H.; *Development and validation of normal-phase HPTLC method for the simultaneous analysis of lamivudine, stavudina and nevirapine in fixed-dose combination tablets, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54: 445-450.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B.; *Quantitative NMR spectroscopy – Applications in drug analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38: 806-812

INGALE, A.G.; HIVRALE, A.U.; *Pharmacological studies of Passiflora sp. And their bioactive compounds, African Journal of Plant Science*, 2010, 4: 417-46.

JONES, K.; HUGHES, J.; HONG, M.; JIA, QI.; ORNDORFF, S, *Modulation of Melanogenesis by Aloesin: A competitive Inhibitor of Tyrosinase, Pigment Cell Res*, 15: 3335-340, 2002.

JEONG, Y.M.; HA, J.H.; NOH, G.Y.; PARK, S.N.; *Inhibitory Effects of Mung Bean (Vigna radiate L.) Seed and Sprout Extracts on Melanogenesis, Food Science and Biotechnology*, Vol. 25, N° 2, p. 567-573, 2016. KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; HAN, C.; YOON, J.; KIM, N.; SEO, J.; LEE, C.; *Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: A Fluorescence Quenching Study, J. Agric. Food Chem*, 2006, 54: 935-941.

KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; HAN, C.; YOON, J.; KIM, N.; SEO, J.; LEE, C.; *Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: A Fluorescence Quenching Study*, **J. Agric. Food Chem.**, 2006, 54: 935-941.

LAYLOFF, T.; RISHA, P.; KAALE, E.; *TLC for pharmaceutical analysis in resource limited countries*, **Journal of Chromatography A**, 2011, 1218: 2732-2736.

LIU, J.C.; JIAO, Z.; YANG, W.; ZHANG, C.; LIU, H.; Lv, Z.Z.; *Variation in Phenolics, Flavonoids, Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activity of Peach Blossoms at different developmental stages*, **Molecules**, 2015, 20: 20460-20472.

LIU, X.; AHLGREN, S.; KORTHOUT, H.A.A.J.; SALOMÉ-ABARCA, L.F.; BAYONA, L.M.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; *Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using high performance thin layer chromatography-based method*, **Journal of Chromatography A**, Vol. A, N° xxx, p. xxx-xxx, 2017.

LIU, J.C.; JIAO, Z.; YANG, W.; ZHANG, C.; LIU, H.; Lv, Z.Z.; *Variation in Phenolics, Flavonoids, Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activity of Peach Blossoms at different developmental stages*, **Molecules**, 2015, 20: 20460-20472.

LIANG, C.; LIM, J.; KIM, S.; KIM, D.; *Dioscin: A synergistic inhibitor from the roots of Smilax china*, **Food chemistry**, 2012, 134: 1146-1148.

MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B.; *Quantification of the Flavonoid Glycosides in Passiflora incarnata by Capillary Electrophoresis*, **Planta Med**, 2003, 69: 452-456.

MATTEIN, P.; AGATI, G.; PINELLI, P.; GOTI, A.; *Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester*, **Monatsh Chem**, 2014, 1-9.

MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P.L.; GANGEMI, S.; *Passiflora incarnata L: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials*, **Journal of Ethnopharmacology**, 2013, 150: 791-804.

MOMTAZ, S.; LALL, N.; BASSON, A.; *Inhibitory activities of mushroom tyrosinase and DOPA oxidation by plant extracts*, **South African Journal of Botany**, 2008, 74: 577-582.

MARSTON, A.; *Thin-Layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry*, **Journal of Chromatography A**, vol. 1218, p. 2676-2683, 2011.

ORHAN, I.E.; KHAN, M.T.H.; *Flavonoid derivatives as Potent Tyrosinase Inhibitors – A Survey of Recent Findings Between 2008-2013*, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2014, 14: 1486-1493.

ORHAN, I.E.; SENOL, F.S.; ERDEM, S.A.; TATLI, I.I.; KARTAL, M.; ALP, S.; *Tyrosinase and Cholinesterase Inhibitory Potential and Flavonoid Characterization of Viola Odorata L. (Sweet Violet)*, **Phytotherapy Research**, Vol. 29, p. 1304-1310, 2015.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; McCULLAGH, M; *Distinction of the C-glycosy flavone isomer pairs orientin/isoorientina and vitexin/isovitexina using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID*, **Phytochemical Analysis**, 2005, 16: 295-301.

POOLE, C.F.; BERNARD-SAVARY, P.; *Instrument platforms for thin-layer chromatography*, **Journal of Chromatography A**, 2015, 1421: 184-202.

PIAO, L.Z. PARK, H.R.; PARK, Y.K.; LEE, S.K. PARK, J.H.; PARK, M.K.; *Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones*, **Chem. Pharm. Bull**, 2002, 50, 309-311.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; McCULLAGH, M; *Distinction of the C-glycosy flavone isomer pairs orientin/isoorientina and vitexin/isovitexina using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID*, **Phytochemical Analysis**, 2005, 16: 295-301

RADOSEVIC, K.; CURKO, N.; SRCEK, V.G; BUBALO, M.C.; TOMASEVIC, M.; GANIC, K.K.; REDOVNIKOVIC.; *Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity*, **LWT- Food Science and Technology**, 2016, 73: 45-511.

REHWALD, A.; MEIER, B.;STICHER, O.; *Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Passiflora incarnata L.*; **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 1994, 69: 153-158.

SELASH, T.; GILARD, V.; BALAYSSAC, S.; MARTINO-MALET, M.; MARTINO, R.; *Quality assessment of fluoxetine and fluvoxamine pharmaceutical formulations purchased in different countries or via the Internet by ¹⁹F and 2D DOSY ¹H NMR* **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, vol.46: 707-722, 2008.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T.; *Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from Passiflora subpeltava leaves – A promising species of Passiflora*, **Industrial Crops and Products**, 2014, 54, 272-280.

SHERMA, J.; *Review of HPTLC in Drug Analysis: 1996-2009*, **Journal of AOAC International**, 2010, 93: 754-764.

SCHRIPSEMA, J.; *Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects*, **Phytochemical Analysis**, vo.21, pp.14-21, 2009.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; *Metabolomics, Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*, First Edition, 2015.

SHUAYPROM, A.; SANGUANSEMSRI, D.; SANGUANSEMSRI, P.; FRASER, I.H.; WONGKATTIYA, N.; *Quantitative determination of vitexin in Passiflora foetida Linn leaves using HPTLC*, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2016, 6(3): 216-220

SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J.G.; McALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; *Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples*, **Current Opinion in Biotechnology**, 2014, 25: 51-59.

TAIBON, J.; ANKLI, A.; SCHWAIGER, S.; MAGNENAT, C. BOKA, V.L.; PIRES, C.S.; ALIGINNIS, N.; CUENDET, M.; SKALTSOUNIS, A.L.; REICH, E.; STUPPNER, H.; *Prevention of false-positive results: Development of an HPTLC autographic assay for the detection of natural tyrosinase inhibitors*, **Planta Med**, 81, 2015: 1198-1204.

VERPOORTE, R.; ABDEL FARID, I.B. JAHANGIR, M. VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; KIM, H.K.; CHOI, Y.K.; *Fungal infection induced metabolites in Brassica rapa*, **Plant Science**, 2009, 176: 608-615.

WANGTHONG,S.;TONSIRIPAKDEE,I.;MONHAPHOL, T.; NONTABENJAWAN, R.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.P.; *Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection*, **Biomedical Chromatography**, 2007, 21: 94-100.

WOSCH, L.; SANTOS, K.C.; IMIG, D.C.; SANTOS, C.A.M.; *Comparative study of Passiflora taxa leaves: II ,A chromatographic profile*, 2017, 27: 40-49.

YAO, Y.; CHENG, X.; WANG, L., WANG, S.; REN, G.; *Mushroom tyrosinase inhibitors from mung bean (Vigna radiatae L.) extracts*, **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, vol. 63, N° 3, p. 358-361, 2012.

ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; ANGENOT, L.; *Analysis of passion fruit rinds (passiflora edulis): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (Radical Scavenging) capacity*, **Quim. Nova**, 2012, 35: 541-545.

ZHANG, J.; KOIKE, R.; YAMAMOTO, A.; UKIYA, M.; FUKATSU, M.; BANNO, N.; MIURA, M.; MOTOHASHI, S.; TOKUDA, H.; AKIHISA, T.; *Glycosidic Inhibitors of melanogenesis from leaves of Passiflora edulis*, **Chemistry & Biodiversity**.

ZHOU, J.; TANG, Q.; WU, T.; CHENG, Z.; *Improved TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of tyrosinase inhibitors in natural products*, **Phytochemical analysis**, 2017, 28:115-124.

ZOLGHADRI S.; BAHRAMI, A.; KHAN, M.T.H.; MUNOZ-MUNOZ, J.; GARCIA-MOLINA, F.; *A comprehensive review on tyrosine inhibitors*, **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, Vol. 34, N° 1, 279-309.

ZUO, G.; WANG, Z.; QUISPE, Y. N. G.; HWANG, S.H.; KIM, H.Y.; KANG, B.G.; LIM, S.S.; *Target guided isolation of potential tyrosinase inhibitors from Ortholobium pubescens (Poir.) J.W. Grimes by ultrafiltration, high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC*, **Industrial Crops & Products**, vol. 134, p. 195-205, 2019.

ZIELINKA-PISKALAK, A.M.; KALISZEWSKA, D.; MAGDALENA, S.; KISS, A.K.; *Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant Desmodium adscendens using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy*, **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2015, 102:54-63.

APÊNDICE I

Tabela 1 –Tabela para a composição dos excipientes dos medicamentos de cloridrato de sertralina.

Compostos	Medicamentos									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Fosfato de cálcio dibásico di-hidratado (CaHPO ₄ .2H ₂ O)	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dióxido de titânio (TiO ₂)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Talco (Mg ₃ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂)	x	x	✓	✓	x	x	✓	x	✓	✓
Dióxido de silício (SiO ₂)	x	x	x	✓	x	x	x	✓	✓	x
Amidoglicolato de sódio (C ₂ H ₃ NaO ₃)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Propilenoglicol (C ₃ H ₈ O ₂)	x	x	✓	x	x	x	x	✓	x	x
Água purificada (H ₂ O)	x	x	x	✓	x	x	✓	x	✓	x
Polissorbato-80 (C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆)	x	✓	x	x	x	x	x	✓	x	x
Carmelose sódica C ₆ H ₁₂ O ₆ .C ₂ H ₄ O ₂	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓
Hipromelose (C ₅ 6H ₁₀ 8O ₃₀)	✓	✓	✓	x	✓	✓	x	✓	x	x
Estereato de magnésio (C ₃₆ H ₇₀ MgO ₄)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Polietilenoglicol (C _{2n+2} H _{4n+6} O _{n+2})	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	x
Hiprolose (C ₃ H ₈ O ₂) _n	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	x	✓
Celulose monocristalina (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Álcool polivinílico (C ₂ H ₄ O) _x	x	x	x	✓	x	x	✓	x	✓	x
Amido (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n H ₂ O	x	x	✓	x	x	x	x	x	x	x
Corante	✓	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Laca de índio carmim	x	x	✓	x	x	x	x	x	x	x