

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o extrato seco dos bulbos da espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub com alto teor do alcaloide Montanina

MARIELE BRAMBILLA DE ARAÚJO

PORTO ALEGRE, 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o extrato seco dos bulbos da espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub com alto teor do alcaloide Montanina

Dissertação apresentada por **Mariele Brambilla de Araújo** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.05.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bergold

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Diogo dos Santos Miron

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

#### CIP - Catalogação na Publicação

de Araújo, Mariele Brambilla  
Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o extrato seco dos bulbos da espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub com alto teor do alcaloide Montanina / Mariele Brambilla de Araújo. -- 2017.  
92 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. montanina. 2. validação de métodos analíticos. 3. detector de aerossol carregado. 4. ressonância magnética nuclear. 5. espectrometria de massas. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço todo o apoio, atenção e dedicação prestadas na orientação deste trabalho.

Ao Prof. José Angelo Silveira Zuanazzi por todo apoio no fornecimento do extrato utilizado neste trabalho e pela parceria com a empresa Biozeus através de sua patente.

À empresa Biozeus pela parceria principalmente na etapa de caracterização físico-química realizada neste trabalho.

À pesquisadora Marina Scopel pelo trabalho de extração do composto utilizado.

À doutoranda Graciela Carlos agradeço a colaboração e auxílio na realização das análises de RMN e também pela amizade de todas as horas.

À doutoranda Pâmela Lukasewicz agradeço pelo auxílio na realização das análises de CLAE-EM e também pela amizade de todas as horas.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório de padrões secundários Inélia e Viviane agradeço pela amizade, carinho e apoio durante este tempo de convivência.

Aos meus colegas e amigos Andreia, Andrea, Leonardo, Vanessa, Layane, Sendy, Caroline, Natália e Thaís pela ótima convivência e amizade.

À minha médica Marisa Sigal por toda ajuda e conselhos dados a fim de me fazer vencer os desafios nesse período do mestrado.

Aos meus pais, Geni Brambilla de Araújo e João Ademar Silva de Araújo, que investiram suas vidas também na minha realização profissional.

Ao meu noivo Éverson Josué Santos, por todo amor, carinho, compreensão e apoio durante este tempo de mestrado e por estar sempre ao meu lado.



## RESUMO

Os alcaloides têm apresentado diversas atividades biológicas. Entre eles, a montanina vem demonstrando um bom desempenho nesse sentido, como, atividade antioxidante, ação inibitória do crescimento de culturas bacterianas e importante atividade de inibição do crescimento de linhagens tumorais. Atualmente, não existem muitos relatos da sua caracterização ou métodos analíticos quantitativos disponíveis na literatura para atribuir seu teor. Assim, após purificação, a caracterização da montanina foi realizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do ultravioleta (UV), infravermelho (IV), espectrometria de massas (CLAE-EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), de carbono (RMN<sup>13</sup>C) e em 2D homo e heteronucleares tais como COSY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, escalar), NOESY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, dipolar), HSQC (<sup>1</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar) e HMBC (<sup>n</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar). Na sequência, foram desenvolvidos métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada aos detectores ultravioleta e aerossol carregado (CLAE- UV/DAC) para a quantificação da montanina. Os mesmos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Os resultados obtidos foram avaliados por estatística descritiva e os métodos comparados pelo resultado da análise de variância (ANOVA). Desse modo, foram desenvolvidos procedimentos que podem ser aplicados para aprimorar o controle de qualidade, contribuindo para assegurar a eficácia terapêutica da montanina.

**Palavras-chave:** montanina, cromatografia líquida de alta eficiência, validação de métodos analíticos, detector de aerossol carregado, detector de ultravioleta, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas



## ABSTRACT

### **Physical-chemical characterization, development and validation of analytical methods for dry extract of bulbs of the species *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub with high alkaloid Montanine content**

Alkaloids have several biological activities. Among them, montanine have shown antioxidant activity, inhibitory effect on bacterial growth and important activity inhibiting growth of some tumor cell lines. Currently, there are a few reports about its characterization as well as quantitative analytical methods to determine its purity. Thus, after a purification step, montanine will be characterized by its differential scanning calorimetry (DSC), ultraviolet spectroscopy (UV), infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry (HPLC-MS), nuclear magnetic resonance of proton ( $\text{NMR}^1\text{H}$ ), carbon ( $\text{NMR}^{13}\text{C}$ ) and 2D homo and heteronuclear such as COSY ( $^n\text{J}_{\text{H-H}}$ , scalar), NOESY ( $^n\text{J}_{\text{H-H}}$ , dipolar), HSQC ( $^1\text{J}_{\text{H-C}}$ , scalar) and HMBC ( $^n\text{J}_{\text{H-C}}$ , scalar). Further, quantitation methods will be developed employing high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet and charged aerosol detectors (HPLC-UV/CAD). These methods will be validated regarding the parameters specificity, linearity, range, detection limit, quantitation limit, precision, accuracy and robustness. The results will then be evaluated by descriptive statistics and the developed methods will be compared using analysis of variance (ANOVA). Therefore, tests will be developed that can be used to improve quality control, helping to ensure the therapeutic efficacy of montanine.

**KEYWORDS:** montanine, high-performance liquid chromatography, validation of analytical methods, charged aerosol detector, ultraviolet detector, nuclear magnetic resonance, mass spectrometry



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do alcaloide montanina.....19
- Figura 2.** Fotografia da espécie *Rhodophiala bifida* (Luciano Rodrigues Soares, 2011).....24
- Figura 3.** Alcaloides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae. ....26
- Figura 4.** Diferentes tipos de acoplamentos oxidativos do fenol em precursor dos alcaloides de Amaryllidaceae (adaptado de BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2005).....29
- Figura 5.** Curva de aquecimento para o ERM obtida por DSC - calorímetro diferencial exploratório Shimadzu, modelo DSC-60. ....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Espectro de absorção na região do UV para o ERM em metanol. ....
- Figura 7.** Espectro de absorção na região do IV para o ERM (4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ) obtido com espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, Spectrum BX, leitura direta da amostra com acessório ATR. ....
- Figura 8.** Cromatograma obtido por CLAE-EM para o ERM.....
- Figura 9.** Espectro de massas para a Montanina ( $t_r=7,8$  min) adquirido no modo Scan com eletronebulização positiva. ....
- Figura 10.** Espectro de massas para a impureza ( $t_r=4,5$  min) adquirido no modo Scan com eletronebulização positiva. ....
- Figura 11.** Estrutura dos alcaloides Nangustina, Pancracina e Brunsvigina (adaptado de JIN, 2013). ....
- Figura 12.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.....
- Figura 13.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.....
- Figura 14.** Cromatograma obtido para montanina e impurezas por CLAE-UV (1) ACN; (2), (3), (4), (5) e (7) impurezas; (6) montanina. ....

<b>Figura 15.</b> Cromatogramas da solução de ERM não submetida às condições de degradação, (A) CLAE-UV e (B) CLAE-DAC. ....	
<b>Figura 16.</b> Especificidade dos métodos para ERM submetido à hidrólise ácida. ....	
<b>Figura 17.</b> Especificidade dos métodos para ERM submetido à hidrólise básica.....	
<b>Figura 18.</b> Especificidade dos métodos para ERM submetido à oxidação. ....	
<b>Figura 19.</b> Especificidade dos métodos para ERM submetido à fotólise, (A) CLAE-UV, (B) CLAE-DAC.....	
<b>Figura 20.</b> Especificidade dos métodos para ERM submetido à degradação térmica, (A) CLAE-UV, (B) CLAE-DAC. ....	
<b>Figura 21.</b> Representação gráfica da curva analítica média da montanina por CLAE-UV. ....	
<b>Figura 22.</b> Representação gráfica da curva analítica média da montanina por CLAE-DAC.....	
<b>Figura 23.</b> Representação gráfica dos resíduos gerados pelas regressões.....	
<b>Figura 24.</b> Espectro 2D COSY (400 MHz) do ERM utilizando CDCl <sub>3</sub> como solvente. ....	79
<b>Figura 25.</b> Espectro 2D NOESY (400 MHz) do ERM utilizando CDCl <sub>3</sub> como solvente.....	79
<b>Figura 26.</b> Espectro 2D HSQC (400 MHz) do ERM utilizando CDCl <sub>3</sub> como solvente. ....	80
<b>Figura 27.</b> Espectro 2D HMBC (400 MHz) do ERM utilizando CDCl <sub>3</sub> como solvente. ....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Métodos de caracterização físico-química para montanina já descritos na literatura.....	30
<b>Tabela 2.</b> Frequências das principais bandas do ERM e suas atribuições.....	
<b>Tabela 3.</b> Dados de espectrometria de massas da Montanina. ....	
<b>Tabela 4.</b> Síntese dos resultados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H, COSY e NOESY do ERM.....	
<b>Tabela 5.</b> Síntese dos resultados espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC do ERM.....	
<b>Tabela 6.</b> Métodos analíticos para montanina e outros alcaloides descritos na literatura.....	51
<b>Tabela 7.</b> Especificações dos reagentes. ....	
<b>Tabela 8.</b> Gradiente da fase móvel do sistema cromatográfico utilizado para quantificação da montanina por CLAE-UV/DAC. ....	
<b>Tabela 9.</b> Valores de áreas obtidas para as curvas analíticas da montanina.....	
<b>Tabela 10.</b> Resumo dos resultados do estudo de linearidade. ....	
<b>Tabela 11.</b> ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção das curvas analíticas para a montanina. ....	
<b>Tabela 12.</b> Limites de Detecção e Limites de Quantificação. ....	
<b>Tabela 13.</b> Resultados para precisão intra e interdias para CLAE-UV e CLAE-DAC. ....	
<b>Tabela 14.</b> Esquema de preparo das soluções para o teste de recuperação. ....	
<b>Tabela 15.</b> Resumo dos resultados do ensaio de Exatidão. ....	
<b>Tabela 16.</b> Resumo dos resultados do ensaio de Robustez para CLAE-UV e CLAE-DAC.....	
<b>Tabela 17.</b> Resultados obtidos na determinação da montanina por CLAE-UV e CLAE-DAC.....	



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN:** Acetonitrila
- ANOVA:** Análise de Variância
- ATR:** Refletância total atenuada
- CDCl<sub>3</sub>:** Clorofórmio deuterado
- CH<sub>3</sub>COOH:** Ácido acético
- CLAE-DAC:** Cromatografia líquida de alta eficiência - detector aerossol carregado
- CLAE-EM:** Cromatografia líquida de alta eficiência - espectrômetro de massas
- CLAE-UV:** Cromatografia líquida de alta eficiência - detector ultravioleta
- CLUE:** Cromatografia líquida de ultra eficiência
- COSY:** Correlation spectroscopy
- DAD:** Detector de arranjo de diodos
- DPR:** Desvio padrão relativo
- DPreS:** Desvio padrão residual
- DSC:** Calorimetria exploratória diferencial
- EM:** Espectroscopia de Massas
- ERM:** Extrato rico em montanina
- HMBC:** Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
- HSQC:** Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
- ICH:** International Conference on Harmonization
- IV:** Espectrofotometria na região do infravermelho
- MeOH:** Metanol
- NOESY:** Nuclear overhauser effect spectroscopy
- RMN <sup>1</sup>H:** Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de próton
- RMN <sup>13</sup>C:** Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de carbono
- t<sub>r</sub>:** Tempo de retenção
- USP:** United States Pharmacopeia
- UV:** Espectrofotometria na região do ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>2.CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO RICO EM MONTANINA.....</b>	<b>21</b>
2.1.Introdução.....	23
2.2.Objetivos.....	23
2.3.Revisão .....	23
2.3.1.Origem botânica da espécie <i>Rhodophiala bifida</i> (Herb.) Traub .....	23
2.3.2.Alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae .....	24
2.3.2.1.Atividades farmacológicas .....	25
2.3.3.Alcaloide Montanina .....	27
2.3.3.1.Estudos biológicos.....	27
2.3.3.2.Biossíntese.....	28
2.3.3.3. Caracterização físico-química .....	29
2.4.Caracterização do extrato .....	
2.4.1.Matéria-prima .....	
2.4.2.Calorimetria exploratória diferencial .....	
2.4.2.1.Material e método.....	
2.4.2.2.Resultado e discussão .....	
2.4.3.Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) .....	
2.4.3.1.Material e método.....	
2.4.3.2.Resultado e discussão .....	
2.4.4.Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	
2.4.4.1.Material e método.....	
2.4.4.2.Resultado e discussão .....	
2.4.5.Espectrometria de massas.....	
2.4.5.1.Material e método.....	
2.4.5.2.Resultado e discussão .....	
2.4.6.Ressonância magnética nuclear.....	
2.4.6.1.Material e método.....	
2.4.6.2.Resultado e discussão .....	
<b>3.CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA MONTANINA .....</b>	<b>45</b>
3.1.Introdução.....	47
3.2. Objetivos.....	47
3.3.Revisão .....	47

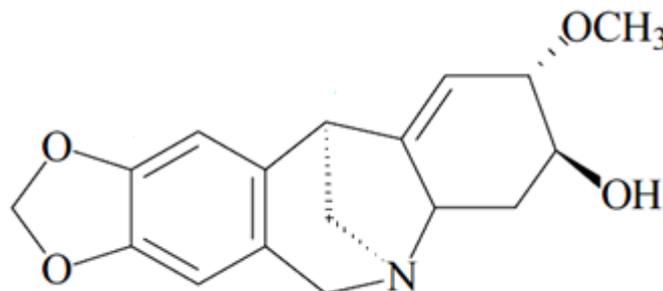
3.3.1. Validação de métodos analíticos .....	47
3.3.2. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos .....	48
3.3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	48
3.3.2.2. Detector DAC .....	49
3.3.2.3. Detector UV .....	50
3.3.3. Literatura analítica envolvendo alcaloides de Amarilidaceas .....	50
3.4. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação da montanina .....	
3.4.1. Matéria-prima .....	
3.4.2. Substância química de referência (SQR).....	
3.4.2.1. Perda por dessecação .....	
3.4.2.2. Impurezas orgânicas .....	
3.4.2.3. Cálculo de pureza da SQR (ERM lote 1) .....	
3.4.3. Reagentes .....	
3.4.4. Equipamentos .....	
3.4.5. Desenvolvimento do método CLAE-UV/DAC.....	
3.4.6. Validação do método CLAE-UV/DAC.....	
3.4.6.1. Especificidade.....	
3.4.6.1.1. Material e método.....	
3.4.6.1.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.2. Linearidade e Intervalo.....	
3.4.6.2.1. Material e método.....	
3.4.6.2.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.3. Limites de detecção e quantificação.....	
3.4.6.3.1. Material e método.....	
3.4.6.3.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.4. Precisão.....	
3.4.6.4.1. Material e método.....	
3.4.6.4.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.5. Exatidão .....	
3.4.6.5.1. Material e método.....	
3.4.6.5.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.6. Robustez .....	
3.4.6.6.1. Material e método.....	
3.4.6.6.2. Resultado e discussão .....	
3.4.6.7. Análise comparativa dos métodos propostos .....	
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>5. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

## **1.INTRODUÇÃO GERAL**



As plantas são uma fonte importante de produtos naturais, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Dentre estes, os alcaloides têm se mostrado especialmente ativos em diversas atividades biológicas e se encontram amplamente distribuídos em muitas espécies de plantas tropicais (GUERRA; NODARI, 2003).

O alcaloide montanina vem sendo estudado quanto a diversas atividades biológicas. Estudos demonstraram que a montanina (Figura 1) apresenta atividades de modulação (ativação) de proteínas relacionadas com processos de formação de memória, atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (PAGLIOSA et al., 2010; SILVA, 2005; STAFFORD et al., 2013), além de atividades psicofarmacológicas, tais como ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (DA SILVA et al., 2006). Outros trabalhos determinaram que a montanina possui atividade antioxidante, ação inibitória sobre o crescimento de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Escherichia coli* (CASTILHOS et al., 2007) e importante atividade de inibição de crescimento de linhagens tumorais (SILVA et al., 2008).



**Figura 1.** Estrutura química do alcaloide montanina.

Em estudos preliminares da composição química dos diferentes órgãos vegetais de espécies da família Amaryllidaceae, foi verificada uma grande quantidade de alcaloides estruturalmente diferenciados, não encontrados em outras famílias vegetais (LOUW; REGNIER; KORSTEN, 2002). Assim, uma investigação sistemática do potencial farmacológico e estudos químicos das espécies de Amaryllidaceae de ocorrência no Rio Grande do Sul foi realizada (HOFMANN et al., 2003; HOFMANN JR et al., 2004; SEBBEN, 2005; SILVA, 2005).

Recentemente, o grupo de pesquisa em Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul isolou o alcaloide montanina da espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (CASTILHOS, 2004; CASTILHOS et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2013). A montanina apresentou elevada concentração nos bulbos desta espécie, que além de ser a única representante deste gênero no estado, é também a única que teve seu conteúdo químico já investigado (GORDELL, 1989; WILDMAN; BROWN, 1968). Neste trabalho, será utilizado o extrato de *R. bifida* (Herb.) Traub rico em montanina.

Para avaliação e monitoramento efetivos de um novo fármaco, é indispensável a elucidação de aspectos ligados às características físico-químicas. Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas tem papel fundamental, uma vez que propicia identificar alterações que possam comprometer a atividade terapêutica ou agregar características tóxicas ao composto (AHUJA, 2001; YOSHIOKA, S.; STELLA, 2002).

A montanina vem sendo estudada quanto às suas propriedades biológicas; no entanto, não existem muitos relatos da sua caracterização ou métodos analíticos quantitativos validados disponíveis na literatura a fim de explorar o potencial farmacológico e físico-químico deste composto. Em 2005, a montanina foi identificada e analisada quanto às suas propriedades químicas (SILVA, 2005). Neste trabalho, as moléculas isoladas foram caracterizadas através de espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no ultravioleta, espectrometria de massas, ponto ou faixa de fusão, polarimetria, espectroscopia de RMN<sup>1</sup>H e espectroscopia de RMN<sup>13</sup>C. Já os sistemas cromatográficos utilizados foram cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia circular com força centrífuga, cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV de diodos em série e cromatografia líquida de média pressão.

Assim, de maneira a ordenar os assuntos abordados, esta dissertação está dividida em dois capítulos. O Capítulo 1 apresenta a caracterização do extrato rico em montanina. Já o Capítulo 2 contempla o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação quantitativa da montanina.

**2.CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO  
RICO EM MONTANINA**



## 2.1.Introdução

As técnicas de caracterização físico-química têm um importante papel no processo de desenvolvimento de fármacos porque ajudam a compreender os mecanismos de administração. A demonstração deste entendimento é esperada pelas agências reguladoras e geralmente é um componente importante no desenvolvimento farmacêutico. A aquisição e interpretação dos resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização físico-química podem ser utilizadas para otimizar o desenvolvimento de formulações e garantir a consistência, qualidade e estabilidade de medicamentos (PALERMO, 2001).

## 2.2.Objetivos

Este capítulo do estudo apresenta como objetivos caracterizar o composto montanina por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), infravermelho (IV), espectrometria de massas (CLAE-EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), carbono (RMN<sup>13</sup>C) e em 2D homo e heteronucleares tais como COSY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, escalar), NOESY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, dipolar), HSQC (<sup>1</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar) e HMBC (<sup>n</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar).

## 2.3.Revisão

### 2.3.1.Origem botânica da espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub

A espécie *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Figura 2) faz parte do gênero *Rhodophiala* da tribo *Hippeastreae* que por sua vez pertence à família Amaryllidaceae.

Para a família Amaryllidaceae já foram descritos aproximadamente 14 tribos, 58 gêneros (MEEROW et al., 2000) e 870 espécies (JUDD et al., 2015). Esta família ocorre no continente africano, principalmente na África do Sul e em alguns países da América do Sul. No entanto, alguns gêneros desta família podem ser encontrados também na Austrália, Malásia, países próximos ao Mediterrâneo e no continente asiático (ITO et al., 1999).



**Figura 2.** Fotografia da espécie *Rhodophiala bifida* (Luciano Rodrigues Soares, 2011).

Os gêneros da tribo *Hippeastreae* são amplamente distribuídos no continente americano, e em sua maioria, na América do Sul, como: *Phaedranassa*, *Urceolina*, *Eucrasia*, *Eucharis*, *Hymenocallis*, *Paramongaia*, *Stenomessom*, *Chlidanthus*, *Eustephia*, *Rhodophiala*, *Zephyranthes*, *Sprekelia* e *Hippeastrum*, enquanto que em outros locais como a Ásia e Mediterrâneo, é encontrado um número reduzido de gêneros (ITO et al., 1999).

A família está pouco representada no Brasil. Somente os gêneros *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Alstroemeria*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Habranthus*, *Worseleya*, *Griffinia* (JOLY, 2002; MEEROW et al., 1999) e *Rhodophiala* (CASTILHOS et al., 2007) foram relatados, sendo encontrados preferencialmente em campos, caatingas e regiões úmidas montanhosas (SCHULTZ, 1990). No Estado do Rio Grande do Sul, foram identificados até o momento, seis gêneros desta família: *Crinum* (1 espécie), *Habranthus* (5 a 6 espécies), *Zephyranthes* (3 a 4 espécies), *Alstroemeria* (1 espécie), *Hippeastrum* (8 espécies) e *Rhodophiala* (1 espécie).

### **2.3.2. Alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae**

Os estudos envolvendo alcaloides de Amaryllidaceae tiveram início no século XIX com o isolamento da licorina de *Narcissus pseudonarcissus*. Porém, apenas em 1950, estes foram retomados com maior intensidade (COOK J. W.; LOUDON J. D., 1952; GHOSAL et al., 1988; HENDRICKSON, 1965) principalmente devido às potenciais atividades antiviral e antitumoral deste grupo de compostos (EVIDENTE et

al., 2004). Desde então, diversas espécies da família foram analisadas quanto ao seu conteúdo alcaloídico (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). Em revisão descrita por CORDELL e colaboradores, (2001), foi relatado o isolamento de 448 alcaloides a partir de 192 espécies pertencentes a 34 gêneros de Amaryllidaceae.

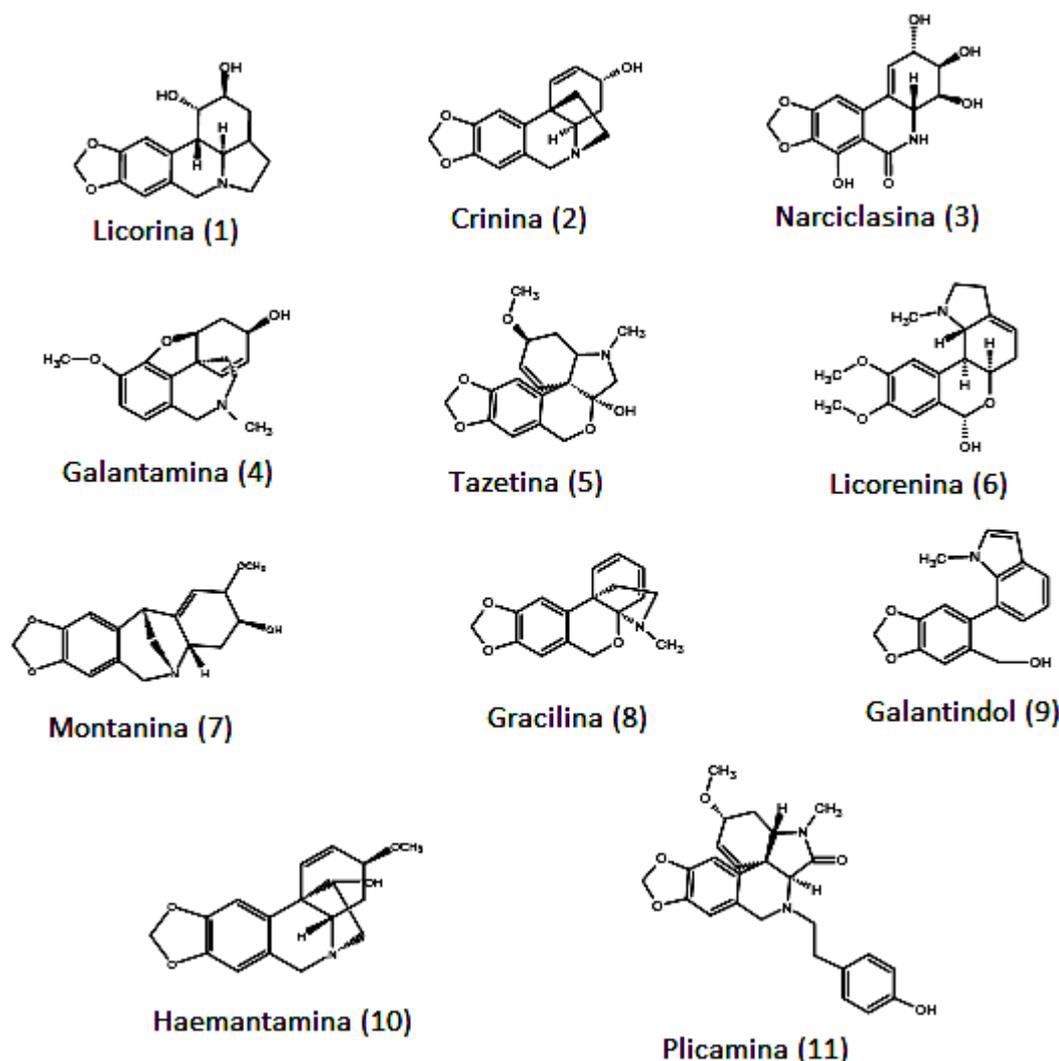
Estes compostos estão presentes em todo o vegetal, porém ocorrem predominantemente nos bulbos (BRUNETON et al., 2001). Ocorre uma variação importante no teor de alcaloides conforme o estágio de desenvolvimento da planta e parte relacionada (ELGORASHI et al., 2003; ELGORASHI; DREWES; STADEN, 2002; GHOSAL; KUMAR; SINGH, 1984). As diferenças no conteúdo e teor de alcaloides também podem ser grandes quando comparadas diferentes espécies pertencentes a um mesmo gênero (ELGORASHI et al., 2003).

Os alcaloides de Amaryllidaceae são derivados da fenilalanina e da tirosina e possuem como estrutura básica o núcleo tetraidroisoquinolínico (BRUNETON et al., 2001). Em 1998, HOSHINO classificou estes compostos de acordo com 7 núcleos principais, para os quais os alcaloides representativos são: licorina (1), crinina (2), narciclasina (3), galantamina (4), tazetina (5), licorenina (6) e montanina (7). Alguns anos depois, alguns autores introduziram outros quatro esqueletos baseados na estrutura dos alcaloides gracilina (8), galantindol (9), haemantamina (10) e plicamina (11), totalizando 11 núcleos fundamentais (Figura 3) (HOSHINO, 1998; ÜNVER et al., 1999, 2003).

### **2.3.2.1. Atividades farmacológicas**

Dados da literatura demonstram que a atividade biológica e os efeitos tóxicos de plantas da família Amaryllidaceae são devidos à presença de alcaloides (BRUNETON et al., 2001; IEVEN et al., 1982). Estes compostos apresentam propriedades intrínsecas com grande potencial farmacológico, o que é bem reportado por diversos estudos que indicam atividades antitumoral, antiviral, antimalárica, analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana (CAMPBELL et al., 1998; GABRIELSEN et al., 1992; LEWIS, 1990; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; MARTIN, 1987; VILADOMAT et al., 1997). A partir da descoberta do alcaloide galantamina como potente inibidor da enzima

acetilcolinesterase e, conseqüentemente, importante no tratamento da doença de Alzheimer, o interesse no isolamento e caracterização dos alcaloides de Amaryllidaceae vem aumentando exponencialmente (ELGORASHI; VAN STADEN, 2004).



**Figura 3.** Alcaloides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.

A identificação do conteúdo alcaloídico de uma planta, bem como a identificação de novos núcleos químicos, os quais são frequentemente associados a propriedades farmacológicas específicas, podem levar ao entendimento de uma relação estrutura-atividade. Isso serve de ferramenta para o desenvolvimento de análogos sintéticos com o objetivo de ampliar o número de moléculas disponíveis para avaliação farmacológica (LEWIS et al., 1996). Nesse contexto, estudos de relação estrutura-

atividade indicaram que a presença do grupamento metilenodioxí, existente na maioria dos alcaloides de Amaryllidaceae, é considerada um indicativo de potencial atividades antiviral e citotóxica destas moléculas (MONTANHA et al., 1995; WU et al., 1989).

A avaliação química e dos efeitos biológicos de plantas da família Amaryllidaceae constituem linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de Farmacognosia neste Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sendo que algumas espécies já foram investigadas com resultados promissores (CASTILHOS et al., 2007; DE ANDRADE, 2007; GIORDANI, 2007; HOFMANN JR et al., 2004; SEBBEN, 2005; SILVA, 2005).

### **2.3.3. Alcaloide Montanina**

#### **2.3.3.1. Estudos biológicos**

Os primeiros trabalhos envolvendo o alcaloide montanina investigaram espécies do gênero *Haemanthus*. No primeiro trabalho em que foi possível caracterizar sua estrutura, ela foi isolada de *Haemanthus tigrinus*, mas já havia sido isolada anteriormente de *Haemanthus amarylloides* (INUBUSHI et al., 1960). No mesmo ano, foi relatado o isolamento do alcaloide da espécie *Hippeastrum aulicum*, assim como de outros 11 alcaloides (BOIT; DÖEPKE, 1960). Os trabalhos com os alcaloides de Amaryllidaceae continuaram, assim como com a montanina e, em 1976, no trabalho de WILDMANN e OLESEN, comprovou-se que a montanina era originária do precursor O-metilnorbeladina.

Após isso, o isolamento de montanina a partir de plantas da família Amaryllidaceae ocorreu somente em 1994, de uma espécie híbrida do gênero *Hippeastrum*, também isolada dos bulbos (MUGGE et al., 1994). Novamente, em 2005, o alcaloide foi isolado de espécies do gênero *Haemanthus*, mais especificamente das espécies *H. paucifolius* e *H. deformis* (CROUCH et al., 2005); no entanto, os únicos trabalhos que envolvem isolamento químico e avaliação de atividade biológica, foram realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório de Farmacognosia desta Faculdade de Farmácia (UFRGS).

Há alguns anos, este grupo de pesquisa isolou o alcaloide montanina de uma espécie de Amaryllidaceae nativa do nosso estado (*Hippeastrum vittatum* L'Hér. Herbert) no trabalho de SILVA, 2005. Além de atividades psicofarmacológicas apresentadas por este alcaloide, tais como ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (DA SILVA et al., 2006), o alcaloide montanina apresentou atividades de modulação (ativação) de proteínas relacionadas com processos de formação de memórias, inibição da enzima acetilcolinesterase (SILVA, 2005) e importantes atividades de inibição de crescimento de várias linhagens tumorais (SILVA et al., 2008), com valores de IC<sub>50</sub> bem inferiores ao preconizado pelo INC (Instituto Nacional do Câncer – Estados Unidos da América) para ser considerado ativo (PISHA et al., 1995).

Este grupo de pesquisa da UFRGS também investigou a espécie *Rhodophiala bifida* (CASTILHOS, 2004; CASTILHOS et al., 2007) cujo extrato também foi utilizado no presente trabalho. Desta espécie foram isolados dois alcaloides já conhecidos: a nangustina e a montanina. A montanina, assim como para *Hippeastrum vittatum*, foi o alcaloide majoritário encontrado nos bulbos da espécie. Foram realizados também ensaios biológicos, apresentando ação inibitória frente ao crescimento de culturas de bactérias, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de demonstrar significativa atividade citostática sobre todas as linhagens celulares tumorais testadas.

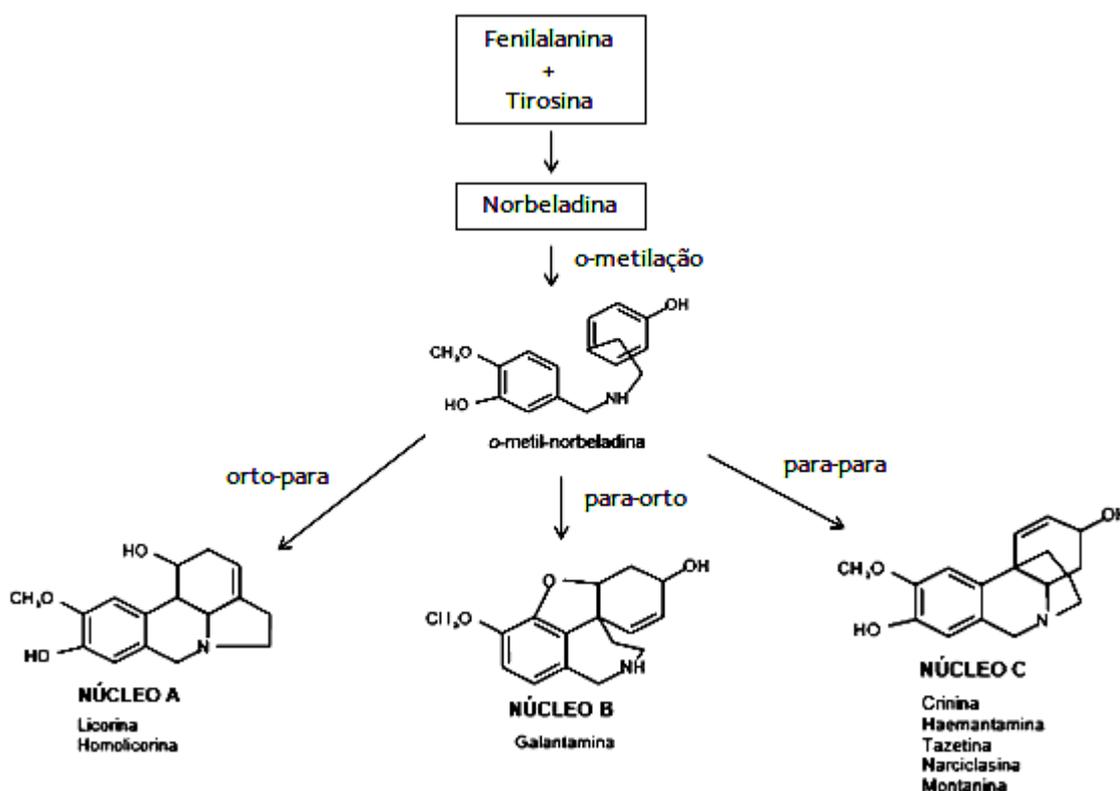
### **2.3.3.2. Biossíntese**

As espécies da família Amaryllidaceae sintetizam seus alcaloides a partir de um precursor universal, que é originado com a junção dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, a norbeladina (EICHHORN et al., 1998; WILDMAN, 1960). A comprovação de que a montanina é originada por este mesmo precursor foi feita por WILDMANN e OLESEN, 1976.

A teoria mais aceita atualmente sobre as vias que levam à síntese dos vários tipos de estruturas encontradas nos alcaloides de Amaryllidaceae foi proposta por BARTON e COHEN em 1957. Eles sugeriram a formação de três esqueletos básicos

distintos, todos a partir do precursor norbeladina (GEISSMAN, 1969). Apesar desta definição ser bastante antiga, é utilizada até hoje, com algumas adaptações.

A norbeladina é formada durante a primeira fase da biogênese, a partir da adição da fenilalanina (que fornece sete carbonos) à tirosina (que fornece oito carbonos). Posteriormente, a norbeladina sofre uma o-metilação gerando um intermediário importante: a o-metil-norbeladina. Esse intermediário sofre acoplamento oxidativo e produz uma segunda ciclização na molécula. O referido acoplamento pode ocorrer de modo orto-para (originando o Núcleo A), para-orto (Núcleo B) ou para-para (Núcleo C) (GEISSMAN, 1969), conforme representado na Figura 4.



**Figura 4.** Diferentes tipos de acoplamentos oxidativos do fenol em precursor dos alcaloides de Amaryllidaceae (adaptado de BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2005).

### 2.3.3.3. Caracterização físico-química

Em relação à caracterização dos alcaloides do gênero *Rhodophiala* a literatura mostra-se ainda num estágio inicial de investigação, onde suas características químicas ainda estão sendo delineadas, o que justifica a caracterização físico-química feita no

presente trabalho. Contudo alguns trabalhos já caracterizaram extratos ricos em montanina também obtidos de outras espécies da família Amaryllidaceae (Tabela 1).

**Tabela 1.** Métodos de caracterização físico-química para montanina já descritos na literatura.

<i>Espécies botânicas</i>	<i>Métodos</i>	<i>Referências</i>
<i>Haemanthus coccineus</i>	EM, RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C	(STAFFORD et al., 2013)
<i>Hippeastrum vittatum</i>	Ponto de fusão, UV, IV, Rotação específica, EM, RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C	(SILVA, 2005; SILVA et al., 2008)
<i>Rhodophiala bifida</i>	CCD, RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C	(CASTILHOS, 2004; CASTILHOS et al., 2007)
<i>Haemanthus tigrinus</i> e <i>Haemanthus amarylloides</i>	Ponto de fusão, Rotação específica e IV	(INUBUSHI et al., 1960)

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da dissertação ocupa o intervalo de páginas 30 – 44, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da caracterização do extrato seco dos bulbos da espécie *Rhodophiala bifida* rico em montanina por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), infravermelho (IV), espectrometria de massas (CLAE-EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), carbono (RMN<sup>13</sup>C) e em 2D homo e heteronucleares tais como COSY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, escalar), NOESY (<sup>n</sup>J<sub>H-H</sub>, dipolar), HSQC (<sup>1</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar) e HMBC (<sup>n</sup>J<sub>H-C</sub>, escalar).



























**3.CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA MONTANINA**



### **3.1.Introdução**

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, para assegurar que a metodologia seja exata, específica, reprodutível e robusta (RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2007; SHABIR, 2003). A validação de um método é um processo contínuo, que inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento da metodologia, através de calibrações e qualificações de instrumentos e materiais, além de treinamento adequado de pessoal (RIBANI et al., 2004; SHABIR et al., 2007). Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

### **3.2. Objetivos**

Este capítulo tem como objetivos desenvolver e validar metodologias analíticas para a quantificação da montanina por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de ultravioleta e aerossol carregado (CLAE-UV-DAC) e realizar estudo comparativo entre os métodos quantitativos propostos através de estatística adequada.

### **3.3.Revisão**

#### **3.3.1.Validação de métodos analíticos**

Segundo a ICH (ICH, 2005), o objetivo do procedimento de validação é demonstrar que o método é adequado para o uso pretendido. A validação é aplicada para análises de identificação, controle de impurezas, doseamento e teste de performance. Os parâmetros analíticos normalmente avaliados em uma validação de métodos de separação são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, adequabilidade do sistema e robustez (RAO; NAGARAJU, 2003; ROZET et al., 2007).

Uma série de documentos regulatórios (farmacopeias, guias internacionais e normas nacionais) demonstram a importância da validação de métodos analíticos. Estas normas vêm tendo importante aplicação em laboratórios analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados à finalidade de uso.

No Brasil o processo de validação é regido pela Resolução Específica nº 899 (Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos), publicada em 2003. Tanto os órgãos regulamentadores federais como a USP (*United States Pharmacopeia*) incorporam as diretrizes da ICH, que tratam especificamente da validação de métodos: ICH Q2(R1) “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”.

### **3.3.2. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos**

A utilização de métodos analíticos é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade total de um medicamento. São várias as metodologias e técnicas analíticas utilizadas na identificação, caracterização e quantificação de substâncias, sendo escolhidas avaliando-se fatores relativos à substância e também do método empregado (RIBANI et al., 2004).

Outro fator importante na escolha de um método analítico de quantificação é que o mesmo seja indicativo de estabilidade, ou seja, que tenha a capacidade de separar, detectar e quantificar o produto principal sem a influência de impurezas e/ou produtos de degradação, que podem se originar de processos de produção, embalagem e/ou armazenamento. Os métodos de análises quantitativos devem ser, por sua vez, adequadamente validados (BOUABIDI et al., 2010).

A CLAE vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004). Destaca-se a grande capacidade desta técnica, de separar e quantificar compostos com alta precisão e exatidão.

#### **3.3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A CLAE ocupa um lugar de destaque entre os métodos modernos de análise qualitativa e quantitativa de fármacos e produtos acabados, sendo a técnica mais utilizada nos últimos tempos. A cromatografia é um método físico-químico de

separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes em duas fases, que estão em contato íntimo (ARDREY, 2003; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; POOLE, 2003).

A utilização da CLAE baseia-se em diferentes mecanismos de separação, sendo eles: cromatografia em fase normal, que é baseada na adsorção/dessorção do analito na fase estacionária polar; cromatografia em fase reversa, cuja separação é baseada no coeficiente de partição entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar; cromatografia por troca iônica que é baseada na presença de grupamentos iônicos na fase estacionária, sendo que estes podem ser trocadores de cátions ou de ânions e cromatografia por exclusão, cuja separação é baseada no tamanho das moléculas dos componentes da amostra (DONG, 2006). A escolha da coluna, da fase móvel e do método de detecção possibilita a variação dos mecanismos de separação, permitindo a utilização desta técnica nas diferentes fases de estudo de produtos farmacêuticos (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Diferentes detectores têm sido utilizados, sendo o detector ultravioleta (UV) ainda o carro-chefe nos laboratórios farmacêuticos, devido à excelente confiabilidade, baixo custo, facilidade de utilização, repetibilidade, sensibilidade e aplicações bem documentadas. De fato, esta técnica foi estabelecida como padrão, utilizada como comparativo para novas técnicas (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; POOLE, 2003; RAO; NAGARAJU, 2003). Destaca-se ainda a possibilidade de avaliação de pureza de pico, através da utilização de um detector UV de arranjo de diodos (DAD) que realiza uma varredura em todos os comprimentos de onda. A CLAE ainda pode ser utilizada acoplada com outras técnicas instrumentais, como detector de aerossol carregado (DAC) e espectrômetro de massas (EM).

### **3.3.2.2. Detector DAC**

A utilização da detecção de aerossol carregado é relativamente nova, sendo que os primeiros detectores começaram a ser comercializados em 2004. O DAC é considerado um detector universal, tendo como vantagem a detecção de compostos não voláteis e semi-voláteis, alta sensibilidade, boa precisão, facilidade no uso e

resposta consistente independente das características químicas da molécula (VEHOVEC; OBREZA, 2010).

No sistema de detecção do DAC, a fase móvel é nebulizada por gás ionizado, normalmente nitrogênio. Após, as gotas maiores são removidas. A fase móvel residual é evaporada, resultando em partículas de tamanho uniforme após passar pelo tubo de secagem. Concomitante, uma segunda corrente de gás nitrogênio é ionizada positivamente pela alta tensão do carregador. Em seguida, as partículas do analito e o gás ionizado colidem numa câmara de mistura, onde a carga é transferida para as partículas. Depois de passar por uma armadilha de íons (*ion trap*) para remover o excesso de gás ionizado, ocorre o impacto de partículas carregadas com o coletor. A carga é então transferida e medida por um eletrômetro sensível. O sinal se apresenta em proporção direta com a quantidade de partículas do analito (DIXON; PETERSON, 2002; GÓRECKI et al., 2006).

### **3.3.2.3. Detector UV**

O detector mais amplamente empregado na cromatografia líquida é o ultravioleta (UV). Possui como vantagens a sua alta sensibilidade, ampla faixa de linearidade, um custo relativamente baixo, facilidade de utilização e o fato de que é compatível com a maioria dos solventes utilizados como fase móvel em modo de eluição isocrático ou gradiente. Possui a desvantagem de detectar apenas compostos que possuem na sua estrutura grupos cromóforos, os quais absorvem a luz UV (VERVOORT; DAEMEN; TÖRÖK, 2008).

### **3.3.3. Literatura analítica envolvendo alcaloides de Amarilidaceas**

A Tabela 6 lista os métodos analíticos já descritos na literatura para quantificação de montanina e outros alcaloides da família das Amarilidaceas por CLAE/CLUE acoplada a diversos detectores. A maioria dos trabalhos envolvendo alcaloides não descreve os sistemas cromatográficos utilizados para determinar o teor, nem traz os dados de validação de método. A montanina, em particular, não apresenta estudos de validação de métodos quantitativos reportados.

**Tabela 2.** Métodos analíticos para montanina e outros alcaloides descritos na literatura.

<i>Compostos</i>	<i>Coluna</i>	<i>Modo de Eluição</i>	<i>Fase Móvel</i>	<i>Métodos</i>	<i>Referências</i>
Galantamina e metabólitos	Discovery HS F5 (5 µm x 4,6 mm x 150 mm)	Gradiente	(A) ACN (B) Solução aquosa de acetato de amônio (5 mmol/L) pH 6,8	CLAE-DAD, EM e fluorescência	(MALÁKOVÁ et al., 2007)
Licoramina, hamaina, haemantamina e tortuosina	BEH C18 (1,7 µm x 2,1 mm x 100 mm)	Gradiente	(A) H <sub>2</sub> O:Ácido Fórmico (0,05%) (B) ACN	CLUE-DAD/EM/EM	(KATOCH et al., 2012)
Licorina e candimina	Luna (Phenomenex) FR C18 (4,6 x 75 mm)	Gradiente	(A) H <sub>2</sub> O:ACN:TFA (95:5:0,5) (B) ACN:TFA (100:0,5)	CLAE-DAD	(GIORDANI, 2007)
Licorina e haemantamina	Symmetry (Waters) FR C18 (3,5 µm x 4,6 mm x 75 mm)	Gradiente	(A) H <sub>2</sub> O:ACN:TFA (95:5:0,5) (B) ACN:TFA (100:0,5)	CLAE-DAD e UV (290 nm)	(DE ANDRADE, 2007)
Licorina, breviflorina-A e breviflorina-B	Symmetry (Waters) FR C18 (3,5 µm x 4,6 mm x 75 mm)	Gradiente	(A) MeOH:H <sub>2</sub> O:TFA (14:86:0,01) (B) MeOH:TFA (100:0,01)	CLAE-DAD	(SEBBEN, 2005)
Montanina, licorina, vitatina e pancracina	Novapack (Waters) FR C18 (5µm x 3,9 mm x 150 mm)	Gradiente	(A) MeOH:H <sub>2</sub> O:TFA (10:90:0,01) (B) MeOH:H <sub>2</sub> O:TFA (50:50:0,01)	CLAE-DAD	(SILVA, 2005)
Galantamina e Licorina	Acclain Pepmap C18 1 mm (3 µm x 100 µm x 150 mm)	Gradiente	(A) Solução de bicarbonato de amônio (10 Mm) pH 7,8:MeOH (97,5:2,5) (B) MeOH:Solução de bicarbonato de amônio (10 Mm) pH 7,8 (97,5:2,5)	CLAE-UV (280 nm) e EM	(TAHCHY et al., 2011)



O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da dissertação ocupa o intervalo de páginas 52 – 71, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta do desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a quantificação da montanina por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de ultravioleta e aerossol carregado (CLAE-UV-DAC) e realizar estudo comparativo entre os métodos quantitativos propostos através de estatística adequada.







































#### **4.CONCLUSÕES**

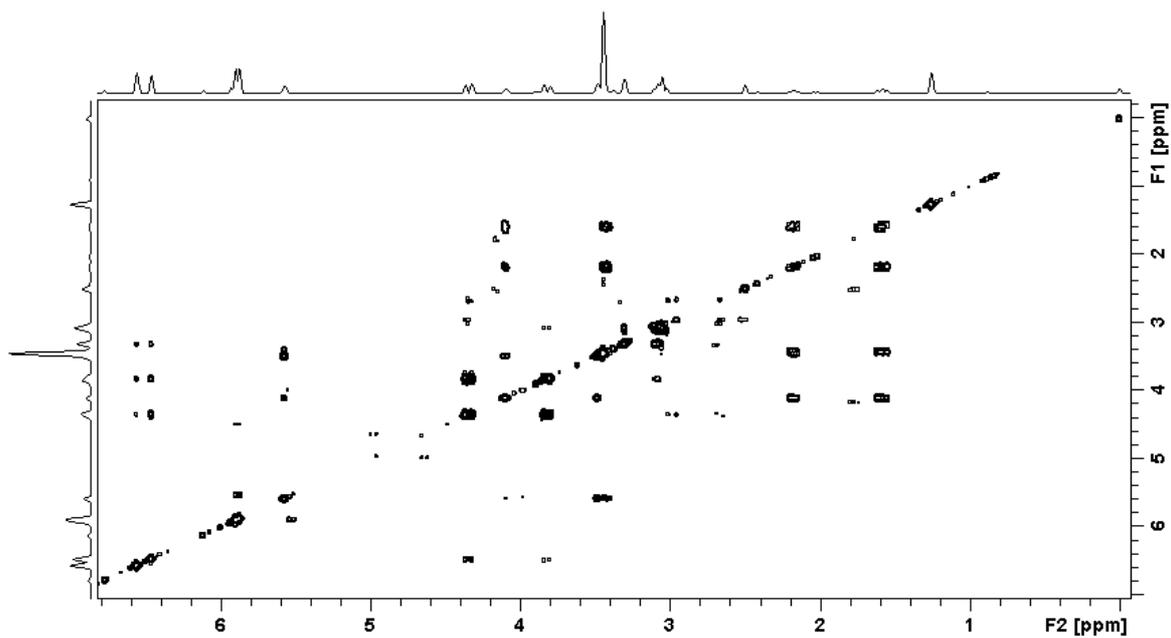


- A faixa de fusão obtida por DSC está de acordo com a literatura e contribuiu para a caracterização do ERM;
- O espectro de UV apresentou bandas características de cromóforos comuns entre os alcaloides de Amaryllidaceae;
- A interpretação do espectro de IV demonstrou que as bandas obtidas são sinais característicos dos grupamentos funcionais presentes na molécula de montanina;
- A análise do espectro de massas do ERM demonstrou a presença do íon molecular  $m/z$  302  $[M+H]^+$  e dos fragmentos referentes à molécula de montanina, contribuindo para a identificação do ERM;
- A interpretação dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, NOESY, HSQC e HMBC demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de montanina;
- O método desenvolvido por CLAE-UV mostrou-se linear na faixa de 40-100 µg/mL, preciso, exato, específico e robusto;
- O método CLAE-DAC mostrou-se linear na faixa de 40-100 µg/mL, preciso e específico; demonstrou exatidão apenas na faixa alta de concentração e robustez parcial (não robusto frente a pequenas alterações no pH e no fluxo da fase móvel) para análise quantitativa do ERM;
- Os métodos CLAE-UV e CLAE-DAC apresentaram diferença significativa nos resultados de recuperação e assim, não podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do teor da montanina.

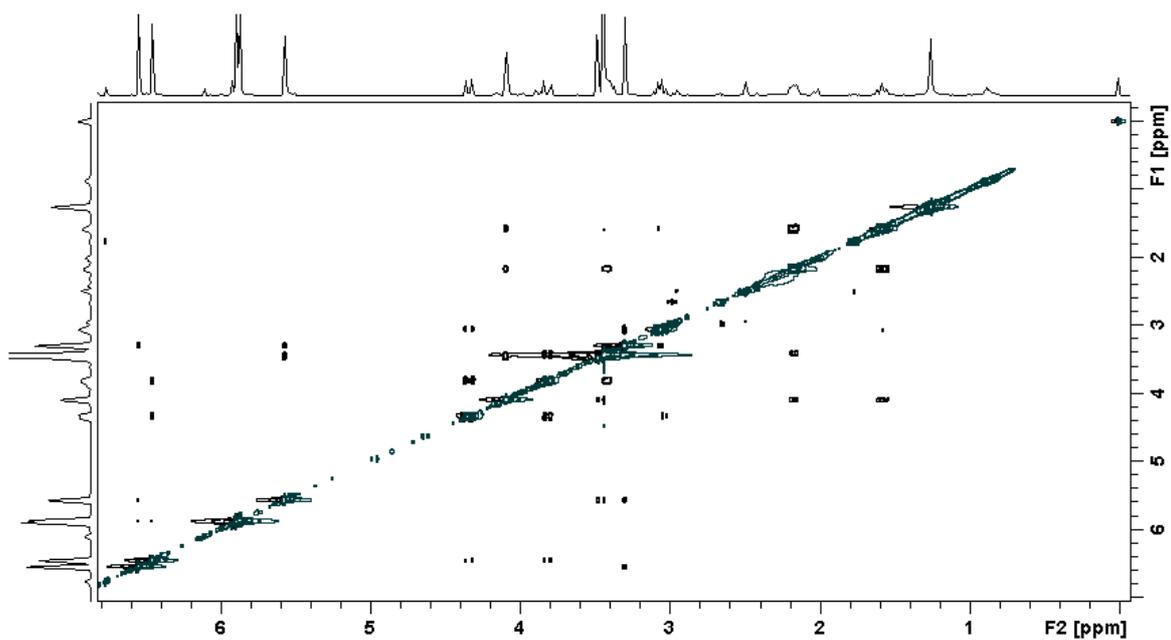




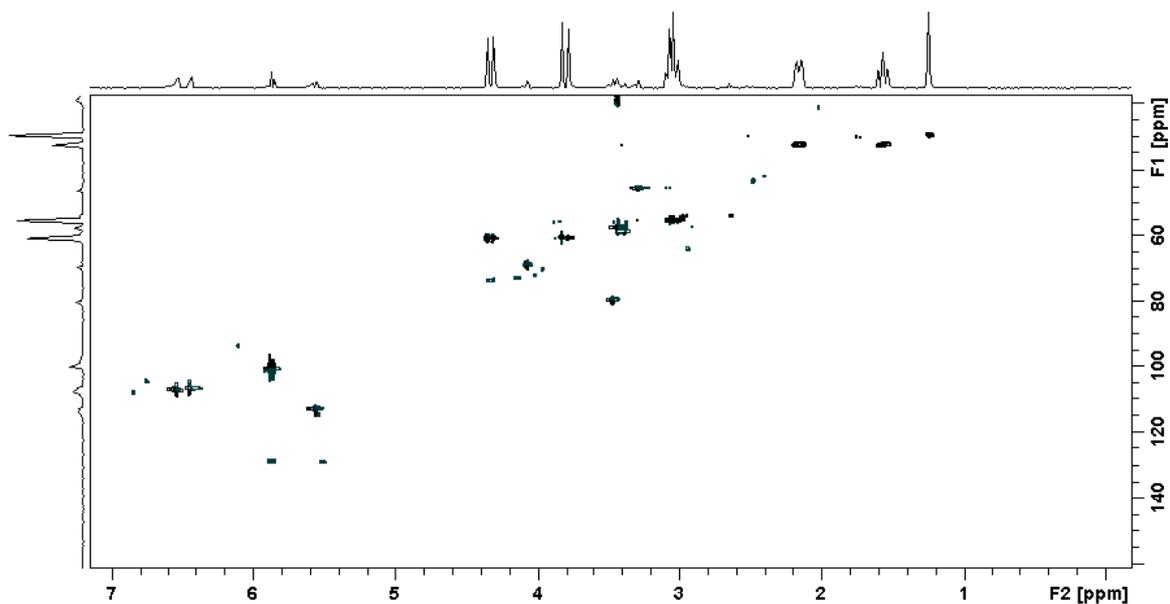




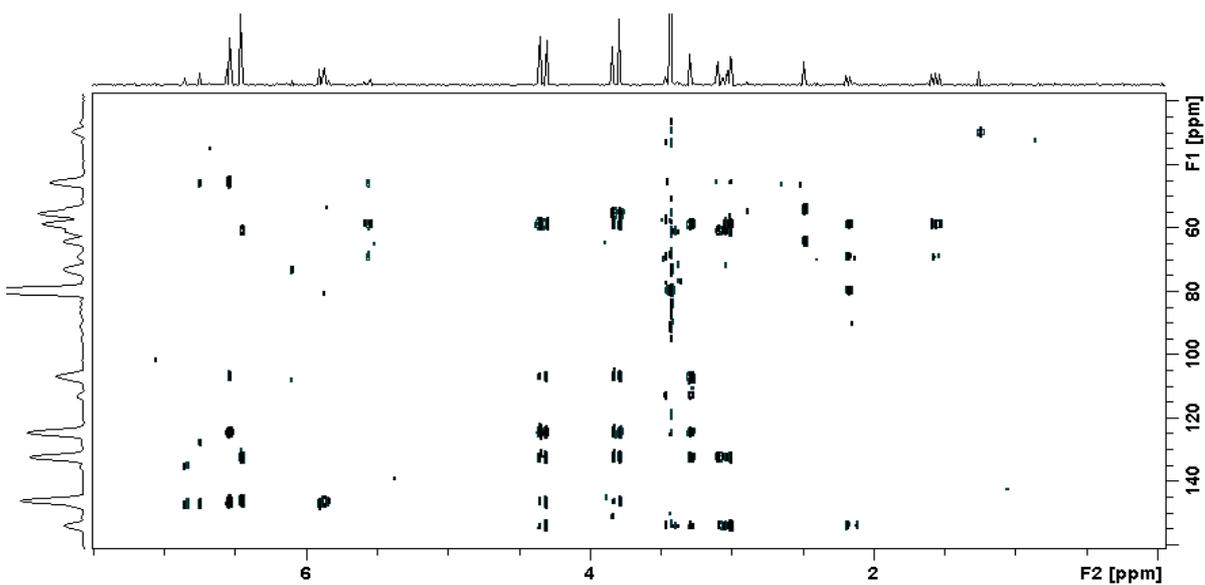
**Figura 5.** Espectro 2D COSY (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.



**Figura 6.** Espectro 2D NOESY (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.



**Figura 7.** Espectro 2D HSQC (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.



**Figura 8.** Espectro 2D HMBC (400 MHz) do ERM utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

## **6.REFERÊNCIAS**



- AHUJA, S. Modern Pharmaceutical Analysis: An Overview. In: **Handbook of modern pharmaceutical analysis**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 1–22.
- ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 50–63, 2012.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry**: an introduction. Chichester: J. Wiley, 2003.
- BALCI, M. **Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy**. 1. ed. Hardbound: Elsevier, 2005.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. San Diego: Academic Press INC., 2005. p. 1099–4831.
- BOIT, H. G.; DÖEPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* var. *robustum*. **Naturwissenschaften**, v. 47, p. 109, 1960.
- BOUABIDI, A. et al. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3180–3192, 2010.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”**. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.
- BRIGGS, L. H. et al. Infrared Absorption Spectra of Methyleneedioxy and Aryl Ether Groups. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 904–911, jun. 1957.
- BRUNETON, J. et al. **micina, plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001.
- CAMPBELL, W. E. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 91–93, 1998.
- CARDOZA, L. A. et al. Separations coupled with NMR detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 766–775, 2003.
- CASTILHOS, T. **Investigação química em *Habranthus erectus* Ravenna e *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Amaryllidaceae) e Avaliação biológica in vitro do alcalóide montanina**. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2004.

- CASTILHOS, T. S. et al. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 209–214, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.
- COOK J. W.; LOUDON J. D. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. Nova Iorque: Academic Press, 1952. p. 331–352.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. LOU; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183–205, 2001.
- CROUCH, N. et al. Alkaloids from three ethnomedicinal Haemanthus species: H. albiflos, H. deformis and H. pauculifolius (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 71, n. 1, p. 49–52, 2005.
- DA SILVA, A. F. S. et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 148–154, 2006.
- DE ANDRADE, J. P. **Análise química e biológica em alcalóides do gênero Hippeastrum (Amaryllidaceae)**. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2007.
- DE OLIVEIRA, P. G. et al. **Processo de extração da fração alcaloídica de Rhodophiala bifida e seu uso como Anti-inflamatório**. Brasil, PI1020130037184, 2013.
- DIXON, R. W.; PETERSON, D. S. Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 13, p. 2930–2937, jul. 2002.
- DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2006.
- EICHHORN, J. R. et al. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1037–1047, 1998.
- ELGORASHI, E. E. et al. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 601–615, 2003.
- ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN, J. VAN. Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 490–495, 2002.

- ELGORASHI, E. E.; VAN STADEN, J. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 27–32, 2004.
- EVIDENTE, A. et al. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2113–2118, 2004.
- GABRIELSEN, B. et al. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 11, p. 1569–1581, 1992.
- GEISSMAN, T. A. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. San Francisco: Freeman, Cooper. , 1969.
- GHOSAL, S. et al. The Role of Ungeremine in the Growth-Inhibiting and Cytotoxic Effects of Lycorine: Evidence and Speculation\*. **Planta Medica**, v. 54, n. 2, p. 114–116, 1988.
- GHOSAL, S.; KUMAR, Y.; SINGH, S. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1167–1171, 1984.
- GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. Crinum Alkaloids: Their Chemistry and Biology. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2141–2156, 1985.
- GIORDANI, R. B. **Estudo químico e farmacológico em *Hippeastrum morelianum* Lem. e *Hippeastrum santacatarina* (Traub) Dutilh: duas espécies de Amaryllidaceae**. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2007.
- GORDELL, G. Dictionary of alkaloids. In: SOUTHON, I. W., BUCKINGHAM, J. (ORG. . (Ed.). . **Dictionary of alkaloids**. London: Chapman & Hall, 1989. p. v. 1 e 2.
- GÓRECKI, T. et al. Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 3186–3192, 1 maio 2006.
- GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 247–253, 2008.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. (ORG), ET AL. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. p. 13–28.
- HENDRICKSON, J. B. **The molecules of nature: a survey of the biosynthesis and chemistry of natural products**. Nova Iorque: W.A. Benjamin, 1965.
- HOFMANN, A. E. et al. Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 12, p. 1455–1456, 2003.

- HOFMANN JR, A. E. et al. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 7–14, 2004.
- HOSHINO, O. The Amaryllidaceae alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Londres: Academic Press INC., 1998. p. 323–417.
- ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In: **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Harmonised Tripartite Guideline: Novembro, 2005.
- IEVEN, M. et al. Plant antiviral agents III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 564–573, 1982.
- INUBUSHI, Y. et al. Structures of Montanine, Coccinine, and Manthine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 25, p. 2153–2164, 1960.
- ITO, M. et al. Phylogenetic Relationships of Amaryllidaceae Based on matK Sequence Data. **Journal of Plant Research**, v. 112, p. 207–216, 1999.
- JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 849–868, 2013.
- JOLY, A. B. **Botânica□: introducao à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- JUDD, W. S. et al. **Plant systematics□: a phylogenetic approach**. 4. ed. Massachusetts: Sinauer, 2015.
- KATOCH, D. et al. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, p. 187–192, 2012.
- KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007.
- LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 7, n. 6, p. 549–556, 1990.
- LEWIS, J. R. et al. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 13, n. 2, p. 171–176, 1996.
- LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 8, p. 1331–1338, 1993.

LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2–3, p. 147–154, 2002.

MALÁKOVÁ, J. et al. High-performance liquid chromatographic method with UV photodiode-array, fluorescence and mass spectrometric detection for simultaneous determination of galantamine and its phase I metabolites in biological samples. v. 853, p. 265–274, 2007.

MARTIN, S. F. The Amarillidaceae Alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC., 1987. p. 251–376.

MASCAVAGE, L. M. et al. Alkaloids. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley, 2010.

MEEROW, A. W. et al. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rpcl* and *trnL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 9, p. 1325–1345, 1999.

MEEROW, A. W. et al. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v. 25, n. 4, p. 708–726, 2000.

MONTANHA, J. et al. Anti-Herpes Virus Activity of Aporphine Alkaloids. **Planta Medica**, v. 61, n. 5, p. 419–424, 1995.

MUGGE, C. et al. Alkaloids from *Hippeastrum* hybrids. **Pharmazie**, v. 49, n. 6, p. 444–447, 1994.

PAGLIOSA, L. B. et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 698–701, 2010.

PALERMO, P. J. Solid Dosage-Form Analysis. In: **Handbook of modern pharmaceutical analysis**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 235–267.

PISHA, E. et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature medicine**, v. 1, n. 10, p. 1046–1051, 1995.

POOLE, C. F. **The essence of chromatography**. Detroit: Elsevier, 2003.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335–377, 2003.

- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. v. 1158, p. 111–125, 2007.
- SCHULTZ, A. **Introdução a Botânica Sistemática**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 1990.
- SEBEN, C. **Investigação Química e Biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae)**. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2005.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration , the US Pharmacopeia and the International Conf. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.
- SHABIR, G. A. et al. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311–333, 2007.
- SILVA, A. F. S. ***Hippeastrum vittatum* (L’Hérb) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados**. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Farmácia, 2005.
- SILVA, A. F. S. et al. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 882–885, 2008.
- SILVA, E. C. DA; PAOLA, M. V. R. V. DE; MATOS, J. DO R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 347–356, 2007.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. . 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- SMITH, R. M. **Understanding mass spectra □: a basic approach**. 2. ed. New Jersey: Wiley Interscience, 2004.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- STAFFORD, G. I. et al. Serotonin transporter protein (SERT) and P-glycoprotein (P-gp) binding activity of montanine and coccinine from three species of *Haemanthus* L. (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 101–106, 2013.

- TAHCHY, A. EL et al. Kinetic Study of the Rearrangement of Deuterium-Labeled 4'-O-Methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* Shoot Cultures by Mass Spectrometry. Influence of Precursor Feeding on Amaryllidaceae Alkaloid Accumulation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2356–2361, 2011.
- TRALDI, P. et al. **Quantitative applications of mass spectrometry**. 1. ed. Chichester: Wiley, 2006.
- ÜNVER, N. et al. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1255–1261, 1999.
- ÜNVER, N. et al. Galanthindole: A New Indole Alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 869–871, 2003.
- URSINI, C. V. Ressonância magnética nuclear de platina-195 em compostos organometálicos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 72–82, 1997.
- USP 39 NF 34. **The United States pharmacopeia**: the national formulary. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeia convention, 2016.
- VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 10, p. 1549–1556, 2010.
- VERVOORT, N.; DAEMEN, D.; TÖRÖK, G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1–2, p. 92–100, 2008.
- VILADOMAT, F. et al. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae. In: PARIDALA, S.G. (Ed.) **Recent Research and Development in Phytochemistry**. 1997. p. 230–261.
- WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005.
- WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: **The alkaloids. Chemistry and physiology**. New York: Academic Press INC., 1960. p. 289–412.
- WILDMAN, W. C.; BROWN, C. L. Mass spectra of 5,11-methanomorphanthridine alkaloids. The structure of pancracine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 23, p. 6439–6446, 1968.
- WILDMANN, W. C.; OLESEN, B. Biosynthesis of Montanine. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communication**, p. 551, 1976.

WU, Y.-C. et al. Cytotoxicity of Isoquinoline Alkaloids and Their N -Oxides. **Planta Medica**, v. 55, n. 2, p. 163–165, 1989.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.

