

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS COMBINADAS PARA INVESTIGAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO¹

Jessyca Bandeira Corrêa², Fernanda Naimann Bernardi³, Ilaine Teresinha Seibel Gehrke⁴.

¹ Pesquisa bibliográfica vinculada ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) e ao Laboratório de Pesquisa em Química (LAPEQUI) da UNIJUI.

² Mestranda do Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Laboratório de Pesquisa em Química (LAPEQUI), je.correa@yahoo.com.br

³ Farmacêutica graduada pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), nandan_bernardi@hotmail.com

⁴ Docente do Departamento de Ciências da Vida da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Laboratório de Pesquisa em Química (LAPEQUI), ilaine@unijui.edu.br

INTRODUÇÃO

O reino vegetal, com sua diversidade e sua variabilidade de espécies, tem representado uma fonte importante de substâncias bioativas. Produtos do metabolismo secundário vegetal ainda são os principais componentes de medicamentos e estão associados à menor incidência e menor mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis como o diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e diferentes tipos de câncer (WCRF, 2007; SÁ, 2008).

No entanto, o uso de plantas como fontes de novos fármacos é um campo ainda pouco explorado. Dentre as estimadas 250-500 mil espécies de plantas, somente 5% têm sido estudadas quanto à fitoquímica e uma porcentagem ainda menor tem sido avaliada sob aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Dessa forma, pouco se sabe acerca dos constituintes químicos destes vegetais e do seu potencial terapêutico (GEHRKE, 2012).

Os metabólitos oriundos de vegetais, em comparação com metabólitos de outros organismos, são constituídos por uma vasta variedade de estruturas químicas de propriedades químicas e físicas diversas (VILAS-BOAS et al., 2007). O número total de metabólitos no reino vegetal é estimado entre 100.000 e 200.000 e varia de acordo com condições fisiológicas, ambientais e é dependente da própria base genética da planta (HILL et al., 2013). A diversidade de espécies e a enorme variedade de constituintes químicos presentes em plantas, têm exigido estudos voltados à investigação, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas complementares para extrair, detectar, quantificar e identificar estruturas químicas (HILL et al., 2015).

A caracterização e a identificação de substâncias presentes em extratos de plantas continuam sendo realizadas segundo metodologias fitoquímicas tradicionais. As substâncias são isoladas por metodologias bastante demoradas e as técnicas de caracterização e identificação são dispendiosas e, muitas vezes, ineficientes para identificar e quantificar as substâncias presentes (RODRIGUES, 2007). A crescente demanda por princípios ativos, a busca pela obtenção de informações rápidas que possam reduzir a variabilidade potencial dos metabólitos em plantas e demais sistemas biológicos bem como a investigação dos efeitos farmacológicos e tóxicos de uma determinada amostra, são requisitos importantes na previsão de sua aplicabilidade como potencial agente terapêutico. Nesse sentido, são requeridas técnicas rápidas, sensíveis e robustas que permitam a caracterização e a identificação estrutural de compostos em tempo real em amostras complexas.

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

As técnicas combinadas (técnicas hífenadas) têm recebido atenção para a resolução de problemas de caracterização de amostras biológicas e extratos complexos de espécies vegetais e animais (PATEL et al., 2010). Os métodos cromatográficos podem ser utilizados separadamente ou em conjunto dependendo da classe dos compostos de interesse a serem separados ou identificados. A cromatografia líquida (geralmente a HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são acopladas a detectores espectrométricos como a espectrometria de massa (MS) ou espectroscópicos como a ressonância magnética nuclear (RMN). Dessa forma, temos técnicas modernas combinadas para a separação, detecção e identificação de metabólitos: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), cromatografia líquida acoplada a ressonância magnética nuclear (LC/RMN) entre outras de alta performance (PATEL et al., 2010; PENG et al., 2014; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013., HUANG et al., 2015., HUANG et al., 2014).

Nessa perspectiva, o presente trabalho propõe-se a mostrar as principais técnicas analíticas usadas para obtenção de perfis químicos, caracterização e identificação de metabólitos secundários em diferentes matrizes biológicas.

METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão narrativa que, por definição apresenta uma temática mais aberta, onde a seleção dos artigos é arbitrária e constitui em uma abordagem ampla e apropriada para descrever um tema de estudo (CORDEIRO et al., 2007). A pesquisa bibliográfica envolveu periódicos científicos, livros, dissertações e teses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias oriundas do metabolismo secundário de plantas têm sido uma valiosa fonte de princípios ativos. No entanto, a descoberta de metabólitos que venham a contribuir como alvos moleculares necessitam de técnicas para triagem de extratos complexos.

O grande avanço das técnicas de separação, caracterização e identificação cromatográficas inclui as cromatografias gasosa (GC) (DIAS et al., 2015) e líquida (LC) (HILL; ROESSNER, 2015) que são associadas a técnicas espectrométricas e espectroscópicas, tais como MS (CHOKKATHUKALAM et al., 2014) e RMN (JOHNSON; LANGE, 2015). As técnicas combinadas têm representado novas estratégias para caracterização do perfil químico de amostras complexas de diferentes extratos, de origem animal e vegetal.

A GC foi primeiramente aplicada à separação de uma série de ácidos graxos (JAMES; MARTIN, 1952). Posteriormente essa técnica passou a ser o primeiro instrumento analítico controlado por um computador (TANG; ROW, 2013). A GC é uma técnica consolidada para a análise de misturas que contêm compostos voláteis e semivoláteis, sendo que seu uso está amplamente difundido nos laboratórios de pesquisas das mais diversas áreas, como petroquímica, fragrâncias, farmacêutica e ambiental (PEDROSO, 2011).

Na GC os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária (FE) e fase móvel (FM). Uma corrente de gás (fase móvel) passa continuamente por uma coluna e quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nesta corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

que gera um sinal para o registrador (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). A GC é uma técnica de alta sensibilidade, o que permite que a quantidade de amostra a ser utilizada seja pequena (em μg). No entanto, apesar de simples, apresenta algumas desvantagens, pois depende da volatilidade e estabilidade do composto, além do tempo e custo elevado (HARRIS, 2008; SKOOG, 2007; TANG; ROW, 2013).

Com relação à LC, esta é muito utilizada para o isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas, no controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, em estudos de ecologia química e até estudos quimiossistemáticos, como a análise de tricomas glandulares (PINTO et al, 2002). As fases estacionárias sólidas levam à separação por adsorção e fases estacionárias líquidas por partição. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma extensão da cromatografia líquida clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, com empacotamento de partículas de tamanhos muito reduzidos (3-10 μm), que constituem a FE. A FM circula sob alta pressão, ao longo da coluna, com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de uma FE constituída por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação (NETO; NUNES, 2003; GOMES, 2010). Essa técnica tem sua versatilidade baseada no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1988).

Devido à sua versatilidade, a HPLC vem suprir algumas limitações da GC quanto ao tipo de compostos que podem ser separados, uma vez que a GC só separa compostos voláteis. A HPLC permite automatizar o sistema, reduz o tempo de análise, efetua análises qualitativas e quantitativas e garante a reprodutibilidade dos dados. Essa técnica utiliza uma menor quantidade de FM, o que permite a utilização de solventes tóxicos, raros, ou caros, além do uso de fases estacionárias dispendiosas (GOMES, 2010). No entanto, a HPLC também possui algumas desvantagens, como: custo elevado do equipamento e da sua manutenção, é um sistema complexo, apresenta baixa sensibilidade perante alguns compostos e depende muito da experiência do operador (GOMES, 2010).

Quando às técnicas de separação (GC e LC) passam a ser acopladas a um detector espectrométrico, essas técnicas passam a ser denominadas técnicas analíticas hífenadas e tornam as análises mais eficientes e mais rápidas do que as técnicas convencionais (CROTTI et al., 2006). Como exemplos, podemos citar detectores de espectrometria de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). As técnicas hífenadas são consideradas importantes para a elucidação estrutural e análise de matrizes complexas, possibilitando a caracterização de compostos conhecidos e desconhecidos com alta sensibilidade e seletividade (PACÍFICO et al., 2011). A GC-MS é particularmente adequada para a detecção de compostos voláteis e termicamente estáveis (ou compostos com derivados voláteis). A LC-MS é mais sensível do que a GC-MS e permite a análise de compostos não voláteis termicamente lábeis (HEGRMANN, 2010).

As metodologias hífenadas baseadas no uso das técnicas de LC-MS e LC-MS-MS apresentam alta sensibilidade e potencial de informações substanciais que quando contrastadas com os principais bancos de dados de substâncias orgânicas como Anti Base, Dictionary of Natural Products e Marin Lit, tornam-se uma ferramenta importante, tanto no processo de identificação de novas substâncias como no mapeamento metabolômico de determinadas espécies. Além de serem preferenciais na análise de compostos polares, presentes em extratos vegetais (BUGNI et al., 2008). A maior

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

limitação do uso desses equipamentos é a baixa concentração do componente e o alto custo dos solventes (PINTO et al., 2002).

A técnica de RMN permite a análise de amostras em uma ampla faixa de polaridade e identificação de muitos compostos num só espectro. Porém, para uma elucidação estrutural mais exata, muitas vezes, torna-se necessário o isolamento preparativo (WILSON; BRINKMAN, 2003). Esse sistema de detecção tem grande poder na diferenciação entre isômeros, configurações de açúcar e substituições no anel aromático, além do que, seu acoplamento simultâneo com o detector seletivo de massas (RMN-MS) permite a aquisição de informações adicionais sobre grupos funcionais e massa molecular (RIJKE, 2006).

Nesse contexto, os métodos analíticos mais procurados em metaboloma são aqueles baseados na RMN e MS que permitem uma rápida e alta taxa de transferência e análise automatizada de extratos brutos, e a detecção quantitativa de muitos grupos diferentes de metabólitos (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010; KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011), fornecendo também informações estruturais, incluindo detalhes estereoquímicos (SEGER; STURM, 2010). No entanto, a RMN é menos sensível do que as abordagens baseadas em MS (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011) e, portanto, não é indicada para a determinação de baixos níveis de concentração (LEVSEN; PREISS; GODEJOHANN, 2000). A tendência futura é de que novas técnicas hífenadas permitam acoplamentos ainda mais sofisticados e otimizados.

Atualmente, uma das maiores aplicações das técnicas hífenadas na área de produtos naturais é na chamada derreplicação de misturas complexas, ou seja, na caracterização preliminar dos constituintes de uma mistura para estabelecer quais já foram identificados, evitando o consumo de tempo (WOLFENDER; TERREAUX; HOSTETTMANN, 2000). A derreplicação consiste em detectar e analisar, sem isolamento, um produto natural, uma fração, ou um extrato por meio de informações estruturais, espectroscópicas ou físicas, comparando a informação com base de dados internas e/ou comerciais, chegando à conclusão da existência de compostos inéditos e/ou conhecidos, e determinando uma estratégia racional para o isolamento dessa micromolécula da matriz bruta. A eficiência e a qualidade desse processo determinarão o tempo de obtenção de resultados preliminares para descobrir novas entidades químicas de interesse (JIA, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As novas técnicas de análises hífenadas que englobam modernidade, eficiência, eficácia e rapidez se colocaram no mercado e vem contribuindo substancialmente na separação e identificação de amostras complexas. Entretanto, a diversidade das técnicas isoladas, aliadas ao alto custo ainda é um obstáculo. As metodologias mais frequentes para a análise de matrizes complexas de metabólitos secundários de origem vegetal tem sido as cromatografias (GC ou LC) associadas a analisadores espectrométricos e espectroscópicos. Apesar de consideráveis avanços tecnológicos na separação e análise de metabólitos secundários, a diversidade estrutural e propriedades químicas de produtos de origem animal e vegetal apresentam-se como desafios constantes na acertada caracterização e identificação de compostos em matrizes complexas.

Palavras-chave: técnicas hífenadas; cromatografia gasosa; cromatografia líquida; espectrometria; espectroscopia.

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUGNI, T.S. et al. Marine natural product libraries for high-throughput screening and rapid drug discovery. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1095-1098, 2008.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. *Química Nova*, v. 2, 1998.
- CHOKKATHUKALAM, A. et al. Stable isotope-labeling studies in metabolomics: new insights into structure and dynamics of metabolic networks. *Bioanalysis*, v. 6, p. 511-524, 2014.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7 ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279 p.
- CORDEIRO, A.M. et al. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 34, n.6, p. 428-431, 2007.
- CROTTI, A.E.M. et al. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high molecular weight compounds. In: TAFT, C. A. *Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry*. Kerala, Índia: Research Signpost, 2006.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. *Cromatografia: um breve ensaio*. *Química Nova na Escola*, São Paulo, n. 7, 1988.
- DIAS D.A., et al. Quantitative profiling of polar primary metabolites of two chickpea cultivars with contrasting responses to salinity. *Journal of Chromatography B*, v. 1000, p. 1-13, 2015.
- GEHRKE, I.T.S. *Estudo fitoquímico e biológico das espécies Schinus lentiscifolius, Schinus terebinthifolius, Schinus molle e Schinus polygamus (Anacardiaceae) do RS*. 2012. 184p. Tese (Química Orgânica), Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2012.
- GOMES, S.M.C. *Determinação de antioxidantes por cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica*. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Coimbra, 2010.
- HARRIS, D.C. *Análise química quantitativa*. 7. ed Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868p.
- HEGEMAN, A.D. Plant metabolomics-meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. *Brief Funct Genomics Proteomics*, v. 9, p. 139-148, 2010.
- HILL, C.B.; ROESSNER, U. “Advances in high-throughput LC-MS analysis for plant metabolomics,” in *Advanced LC-MS Applications for Metabolomics*. Ed. De Vooght-Johnson R., London, UK: Future Science Ltd, 2015. p. 58-7.
- HUANG, M. et al. Identification and quantification of phenolic compounds in *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Siebold et Zucc.) Hand.-Mazz. Using liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 108, p. 11-20, 2015.
- HILL C.B. et al. Characterization of ion contents and metabolic responses to salt stress of different *Arabidopsis* AtHKT1;1 genotypes and their parental strains. *Molecular Plant*, 2013.
- HUANG, M. et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Jin-Mu-Gan-Mao tablet by high-performance liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal Separation Science*, v. 37, p. 3497-3508, 2014.

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

JAMES, A.T.; MARTIN, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*, v. 50, p. 679-690, 1952.

JIA, Q. Generating and screening a natural product library for cyclooxygenase and lipoxygenase dual inhibitors. *Study in Natural Products Chemistry*, v. 29, p. 643-718, 2003.

JOHNSON, S. R.; LANGE, B. M. Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. *Front Bioeng Biotechnol*, v. 3, p. 22, 2015.

KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v. 5, p. 536-549, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol*, v. 29, p. 267-275, 2011.

LEVSEN, K.; PREISS, A.; GODEJOHANN, M. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 27-48, 2000.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

PACÍFICO, M. et al. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 488-496, 2011.

PATEL, K.N et al. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm Methods*, v.1, n.1, p. 2-13, 2010.

PEDROSO, M.P. Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2011.

PENG, C. et al. Development and Validation of a Sensitive LC-MS-MS Method for the Simultaneous Determination of Multi component Contents in Artificial Calculus bovis. *Journal of Chromatographic Science*, v. 52, 128-136, 2014.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RODRIGUES, C. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, São Paulo, 2007.

RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 2-18, 2013.

Sá, A.P.C.S. Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygiumcumini*, L. Skeels). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

SKOOG, D.A. *Fundamentos de química analítica*. São Paulo: Thomson, 2007. 999 p.

TANG, B.; ROW, K. H. Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *Journal of Chromatographic Science*, v. 51, n.8, p. 791-806, 2013.

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

VILLAS-BOAS, S. G. et al. Metabolome Analysis: An Introduction, Vol. 24 Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2007.

WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. T. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, p. 325-356, 2003.

WOLFENDER, J. L.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants. *Pharmaceutical Biology*, v. 38, p. 41-54, 2000.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 2007. 987p.